

105 16993

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Aprobación de la tesis

D. Cs. Enrique Rosales Maldonado
Rector Principal

Ph.D. Mario Dena Silva

**Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del
ajo (*Allium sativum* L).**

D. Cs. Elizabeth Córdova Cortés
Coordinadora

**Por:
Mario Dena Silva**

Ph.D. José Luis de la Torre González
Coordinador

**Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**



TM
SB351
.A4
D4
c.1

Marín N. L., México. Diciembre de 1997



1080098291

105

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del
ajo (*Allium sativum* L).**

Por:
Mario Dena Silva

**Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

TM
SB351
.A4
D4
c.1

Marín N. L., México. Diciembre de 1997

TM
SB351
A4
D4



**Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus
del ajo (*Allium sativum* L.).**

Aprobación de la tesis



D. Cs. Enrique Rosales Maldonado
Asesor Principal



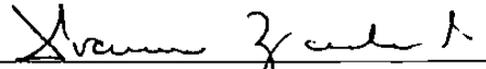
Ph.D. Mario Rocha Peña
Asesor Principal Externo



D. Cs. Elizabeth Cardenas Cerda
Co-asesor



Ph.D. José Luis De la Garza González
Co-asesor



Ph.D. Francisco Zavala García
Sub director de Estudios de Postgrado

DEDICATORIAS

A mi señora madre, Isidra Silva de Dena, de quien he recibido siempre todo su apoyo y cariño, y lo más importante, sus bendiciones. Gracias por todo madre y que Dios la bendiga siempre a Usted también.

A mi señor padre, José Refugio Dena Bernal, por lo que representó para mi en vida y por lo que representa actualmente ante su ausencia física, un gran ejemplo a seguir. Gracias por todo padre, se que está con Dios, pero también en mi mente y mi corazón.

A mis hermanos: Pedro, Javier, Gerardo, Eduardo, Mayela, Arturo, Artemio, Alfonso, Miguel, Beatriz, Adriana y Hugo. Porque la distancia física no ha impedido nunca que los quiera tanto y porque también son una motivación para seguir superándome.

A mis amigos y compañeros de los programas de maestría y doctorado de la Facultad de Agronomía de la UANL, quienes me han dado la oportunidad de compartir buenos momentos con ellos y por todas las muestras de apoyo que me han brindado.

Con una dedicatoria especial para mis amigos, Juan Antonio Galván Romero, Adrián Guevara, Ramón Rodríguez Macías, Arturo Luna, Carmen Ojeda Zacarias, Venancio Orozco Rogero, Mario Leal Chapa, Juan Antonio Hernández Ballesteros, Luis Antonio Moreno Flores, Heladio Linares, José Luis Carlos Rimoldi, Nestali Gómez, Lázaro Martínez González, Nydia Del Rivero Bautista, Wilder Camacho Chiu y Javier de Jesús Cortez Bracho.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por recibirme en sus aulas y darme la oportunidad de seguir preparándome.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico que me brindó a través de la beca-crédito.

Al Dr. Enrique Rosales Maldonado, por darme la oportunidad de realizar este humilde trabajo de investigación.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda. Por todo su apoyo, por las sugerencias hechas al trabajo y por la revisión del escrito.

Al Dr. Mario Rocha Peña, por su incondicional ayuda, sus sugerencias al trabajo y la aportación en infraestructura, reactivos y equipo.

Al Dr. José Luis De la Garza González, por sus sugerencias y la revisión de los escritos.

Al M.C. Fermín Montes Cavazos, Por proporcionar el material vegetal utilizado.

A mi hermano, Ing. Gerardo Dena Silva, a su señora esposa, Profesora Gisela Blancarte de Dena y a sus hijos Iván, Baruch, Elliot y Edgar. Por todo su apoyo moral y económico, y por abrirme siempre las puertas de su bendita casa, por lo que les estaré eternamente agradecido.

A mi hermana, Mayela del Carmen Dena de Ceballos, a su esposo, Francisco Ceballos Ramírez y a sus hijos, Orlando, Brenda, Luis, Claudia, Daniel, Lalito, Brandon y Zaida. Por darme un espacio en su casa y en su mesa. De todo corazón: Muchas gracias.

A la familia Camacho Del Rivero, quienes me han brindado su amistad sincera, así como grandes muestras de apoyo. Gracias por ser mis amigos.

Al M.V.Z. Juan Antonio Hernández Ballesteros y al M.V.Z. Luis Antonio Moreno Flores, por todas las muestras de apoyo y afecto que siempre me han brindado. Gracias por todo compañeros.

Al señor Lázaro Martínez González, Por su desinteresada ayuda y por las sugerencias aportadas durante la realización de este trabajo en el diseño y construcción de los equipos. Gracias amigo Lázaro.

Al Dr. Emilio Olivares Saenz, por su amistad sincera y ayuda durante los análisis estadísticos.

Al Dr. Ciro G. S. Valdés Lozano, por motivarme a continuar adelante en mis estudios.

Con un agradecimiento muy especial a la Dra. Vilma C. Conci, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA), quien desinteresadamente proporcionó los anticuerpos necesarios para los análisis de ELISA, parte fundamental de este trabajo. Gracias por siempre Doctora Conci.

AUTOBIOGRAFÍA

Mario Dena Silva

Candidato a obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola

Tesis:

Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del ajo (*Allium sativum* L).

Área de estudio:

Obtención de plantas sanas *in vitro*.

Datos personales:

Nacido en la ciudad de Torreón, Coahuila, el 10 de Mayo de 1967. Hijo de Isidra Silva de Dena y de José Refugio Dena Bernal.

Egresado de la Universidad Autónoma Chapingo en el año de 1992, donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia.

Fue asesor externo de productores de bajos ingresos en coordinación con FIRA-Banco de México durante los años de 1993 y 1994.

En 1995 ingreso a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León para realizar estudios de postgrado a nivel de Maestría en Ciencias.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.	XI
LISTA DE FIGURAS.	XII
RESUMEN.	XIV
SUMMARY.	XV
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Objetivos.	2
1.2. Hipótesis.	2
2. LITERATURA REVISADA.	3
2.1. Importancia del cultivo.	3
2.1.1. Importancia económica.	3
2.1.2. Importancia medicinal y alimenticia.	3
2.2. Problemas fitopatológicos del ajo.	4
2.2.1. Bacterias.	4
2.2.2. Hongos.	5
2.2.3. Nematodos.	5
2.2.4. Virus.	6
2.2.4.1. Importancia de los virus.	6
2.3. Virosis del ajo.	7
2.3.1. Antecedentes.	7
2.3.2. Virus que infectan el cultivo del ajo.	8
2.3.3. Importancia de los virus del ajo.	8
2.3.4. Clasificación de los virus del ajo.	10
2.3.5. Características de los virus del ajo.	10
2.3.6. Sintomatología causada por los virus del ajo.	11
2.3.7. Transmisión de los virus.	12
2.3.7.1. Transmisión por propagación vegetativa.	12

2.3.7.2. Transmisión por semilla.	12
2.3.7.3. Transmisión por insectos.	13
2.3.7.4. Transmisión desde el suelo.	13
2.3.8. Diagnóstico e identificación de virus.	13
2.3.8.1. Plantas indicadoras.	14
2.3.8.2. Síntomas.	14
2.3.8.3. Inclusiones virales.	14
2.3.8.4. Pruebas serológicas.	15
2.3.8.5. Microscopía electrónica.	15
2.3.8.6. Técnicas moleculares.	16
2.3.9. Métodos de control de virus.	16
2.3.9.1. Quimioterapia.	17
2.3.9.2. Termoterapia y cultivo de meristemos.	17
2.3.9.3. Mejoramiento genético.	19
2.3.9.4. Electroterapia.	19
2.4. La electroterapia en el control de virus vegetales.	20
2.4.1. Concepto de corriente eléctrica.	20
2.4.1.1. Concepto clásico.	20
2.4.1.2. Concepto en electrónica.	20
2.4.2. Clases de corriente eléctrica.	20
2.4.2.1. Corriente eléctrica directa.	20
2.4.2.2. Corriente eléctrica alterna.	21
2.4.3. Ley de Ohm.	22
2.4.4. Resistencia eléctrica.	22
2.4.5. Asociación de resistencias.	23
2.4.5.1. Asociación de resistencias en serie.	23
2.4.5.2. Asociación de resistencias en paralelo.	24

2.4.6. Efectos de la corriente eléctrica sobre los tejidos.	24
2.4.6.1. Acción primaria de la corriente eléctrica directa.	26
2.4.6.2. Acción primaria de la corriente eléctrica alterna.	26
2.4.7. Electroodos.	27
2.4.8. Uso de las corrientes eléctricas en fitopatología.	28
2.4.8.1. Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus.	29
2.5. Inactivación térmica de los virus.	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	32
3.1. Fases de la investigación.	32
3.2. Metodología desarrollada en cada fase.	32
3.2.1. Primera fase: Diseño y construcción del equipo para la electroterapia y sensibilidad del material vegetal a los tratamientos.	32
3.2.1.1. Diseño y construcción del equipo para la electroterapia.	32
3.2.1.1.1. Modelo uno.	33
3.2.1.1.2. Modelo dos.	33
3.2.1.2. Evaluación de la sensibilidad del bulbo-semilla de clones de ajo a la corriente eléctrica.	34
3.2.1.2.1. Preparación del material vegetal.	34
3.2.1.2.2. Aplicación de la corriente eléctrica.	34
3.2.2. Segunda fase: Diagnóstico de los virus OYDV y LYSV.	35
3.2.2.1. Protocolo de DAS-ELISA seguido con los anticuerpos utilizados.	36
3.2.2.2. Reactivos necesarios en la preparación de los buffers para la realización del DAS-ELISA.	37
3.2.3. Tercera fase: Gasto de energía y determinación de la capacidad calorífica del ajo.	38
3.2.3.1. Aplicación de la corriente eléctrica.	38
3.2.3.2. Brotación del material vegetal.	39
3.2.3.3. Cálculo de la energía utilizada durante la aplicación de los tratamientos.	39
3.2.3.4. Determinación de la capacidad calorífica específica de los dientes de ajo.	39

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Primera fase: Diseño y construcción del equipo para la electroterapia y sensibilidad del material vegetal a los tratamientos	41
4.1.1. Diseño y construcción del equipo para la electroterapia.	41
4.1.1.1. Modelo uno.	41
4.1.1.2. Modelo dos.	41
4.1.2. Evaluación de la sensibilidad del bulbo-semilla de clones de ajo a la corriente eléctrica	45
4.1.2.1. Evaluación con el modelo uno	45
4.1.2.2. Evaluación con el modelo dos.	47
4.2. Segunda fase: Diagnóstico de los virus OYDV y LYSV.	51
4.3. Tercera fase: Cálculo de la energía utilizada y de la capacidad calorífica de los dientes de ajo.	54
4.3.1. Cálculo de la energía utilizada durante la aplicación de los tratamientos.	54
4.3.2. Cálculo de la capacidad calorífica específica de los dientes de ajo.	55
5. CONCLUSIONES.	61
6. RECOMENDACIONES.	62
7. LITERATURA CITADA.	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Composición nutritiva de diferentes variedades de ajo.	4
Cuadro 4.1. Análisis de varianza para el efecto del voltaje, tiempo y clon sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de la aplicación de corriente eléctrica con el modelo uno.	45
Cuadro 4.2. Pruebas de comparación de medias (Tukey con $\alpha = 0.05$) para las variables clon y voltaje en los tratamientos con corriente eléctrica aplicados con el modelo uno.	46
Cuadro 4.3. Análisis de varianza para el efecto del voltaje, tiempo y clon sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de la aplicación de corriente eléctrica con el modelo dos.	48
Cuadro 4.4. Pruebas de comparación de medias (Tukey con $\alpha = 0.05$) para las variables clon y voltaje en los tratamientos con corriente eléctrica aplicados con el modelo dos.	48
Cuadro 4.5. Resultados del diagnóstico para los virus OYDV y LYSV con los anticuerpos respectivos para cada uno de estos y con la mezcla.	51
Cuadro 4.6. Energía utilizada y capacidad calorífica específica de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L), clon Cadereyta, con diferentes tratamientos de tiempo y voltaje.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representación gráfica de la corriente eléctrica directa.	21
Figura 2.2. Representación gráfica de la corriente eléctrica alterna.	22
Figura 2.3. Asociación de resistencias en serie.	23
Figura 2.4. Asociación de resistencias en paralelo.	24
Figura 4.1. Esquema de los componentes del modelo uno del equipo para aplicar electroterapia a material vegetal.	42
Figura 4.2. Esquema de los componentes del modelo dos del equipo para aplicar electroterapia a material vegetal.	43
Figura 4.3. Tendencia del efecto del clon sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo uno.	46
Figura 4.4. Tendencia del efecto del voltaje sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo uno.	47
Figura 4.5. Tendencia del efecto del clon sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo dos.	49
Figura 4.6. Tendencia del efecto del voltaje sobre la brotación de dientes de ajo (<i>Allium sativum</i> L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo dos.	49

Figura 4.7. Variación en los valores de capacidad calorífica específica de los dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, por efecto de los diferentes tratamientos de voltaje y tiempo.

56

Figura 4.8. Tendencia de la temperatura final alcanzada por los dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, y los porcentajes de brotación obtenidos con los diferentes tratamientos de voltaje y tiempo.

57

RESUMEN

La corriente eléctrica como una alternativa en la eliminación de virus durante un proceso de saneamiento de plantas, no ha sido investigada a fondo en México. Por otro lado, las enfermedades virales que infectan al cultivo del ajo tampoco han sido todavía estudiadas, aunque en otros países se ha profundizado sobre sus efectos en los rendimientos y la calidad de los productos. Los objetivos del presente trabajo fueron: Diseñar y construir el equipo a utilizar en la aplicación de tratamientos con corriente eléctrica a material vegetal de propagación y evaluar sus efectos sobre semilla asexual de ajo, comprobar la presencia de las enfermedades onion yellow dwarf virus (OYDV) y leek yellow streak virus (LYSV), en bulbo-semilla de clones de ajo cultivados en el estado de Nuevo León y evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre la capacidad de brotación de dientes de ajo, como pretratamiento en la eliminación de virus que atacan este cultivo. Se lograron construir dos modelos para la aplicación de electroterapia a material vegetal de propagación de ajo. La corriente eléctrica aplicada con estos equipos tiene efectos sobre el material de propagación muy similares a los de la termoterapia, al provocar su calentamiento y la disminución en su capacidad de brotación, conforme se incrementa el nivel de voltaje aplicado, disminuye el porcentaje de brotación; también se observó diferente respuesta al tratamiento con respecto a los clones utilizados. En plantas con síntomas visuales de las enfermedades causadas por el complejo viral del ajo, los resultados de los análisis ELISA con anticuerpos específicos, mostraron reacción positiva en las muestras analizadas.

SUMMARY

The electric current as an alternative method for eliminating the virus during the sanitation of the plants, deeply has not researched in Mexico. On the other hand, the virus diseases that infect garlic neither have been studied, although in other countries have been already studied their effects widely on the yields and products quality. The objectives of this work were: Design and manufacture the equipment to use in the application of treatments with electric current on material of plant propagation and evaluate their effects on asexual seed of garlic, verify the presence of the onion yellow dwarf virus (OYDV) and Leek yellow streak virus (LYSV) diseases in seed-bulb of garlic clones cultured in Nuevo Leon state, Mexico, and evaluate the effect of the electric current on sprout capacity of garlic clove. Two prototypes for the application of electrotherapy on material of garlic propagation were constructed. The electric current applied using the devices has effects on the material of propagation. These effects are very similar as thermotherapy; causing heating and decreasing the sprout capacity, when is increased the applied voltage; In addition the sprout percentage is decreased. The effect of the treatment was different related to the used clones. There were plants which showed visual symptoms of the diseases caused by the virus complex of garlic, the results of the ELISA analysis using specified antibodies showed positive reaction in the analyzed samples.

**“Saber más que los otros es
fácil; lo difícil es saber
algo mejor que los otros”**

**Séneca
Filósofo Romano**

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del ajo (*Allium sativum L*) es importante en nuestro país, se cultiva en varios estados de la República Mexicana siendo el estado de Guanajuato el principal productor (Pérez, *et al.*, 1996); en el estado de Nuevo León se puede encontrar en los municipios de Cadereyta, Allende, Montemorelos y General Terán (Huerres y Carballo, citados por Estrella, 1988); constituye un cultivo de importancia económica ya que es ampliamente utilizado como condimento y por sus propiedades medicinales (Cárdenas, 1995).

El ajo se propaga únicamente en forma asexual, lo que trae como consecuencia que las enfermedades virosas se transmitan fácilmente a través de las generaciones, ocasionando pérdidas en los rendimientos. La presencia de enfermedades causadas por virus en ajo ha sido observada en países de los cinco continentes (Bruna *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1994)

Las enfermedades de origen viral son causa de pérdidas económicas en la producción agrícola mundial al reducir los rendimientos en diferentes proporciones; en muchos casos, a pesar de no ser observados síntomas clásicos de una infección, causan pérdidas en la cosecha final. Por lo anterior, el principal problema que limita la producción de ajo es la falta de "semilla" certificada.

Por la importancia económica que representa este cultivo, se deben considerar medidas de prevención y/o control ante los factores que pueden mermar su producción (Pérez *et al.*, 1996).

Los métodos más utilizados para obtener plantas libres de virus son la termoterapia y el cultivo de meristemos *in vitro*, (Quak, 1977), así mismo, se han intentado otros métodos como la quimioterapia, la radiación y el ultrasonido pero los resultados no han sido satisfactorios (Guerrero, 1978; Dunez, 1987).

El uso de la electroterapia como tratamiento para saneamiento de plantas puede llegar a ser considerado como una nueva opción; sin embargo, es necesario desarrollar el conocimiento y los medios necesarios para un óptimo aprovechamiento de la misma; es decir, las condiciones necesarias para su uso, alcances, limitaciones, perspectivas, efectos y causas de éstos, así como su redituabilidad económica.

1.1 Objetivos

Con la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1. Diseñar y construir el equipo a utilizar en la aplicación de tratamientos con corriente eléctrica a material vegetal y evaluar sus efectos sobre semilla asexual de ajo.
2. Comprobar la presencia de las enfermedades onion yellow dwarf virus (OYDV) y leek yellow streak virus (LYSV), en bulbo-semilla de clones de ajo cultivados en el estado de Nuevo León.
3. Evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre la capacidad de brotación de dientes de ajo, como pretratamiento en la eliminación de virus que atacan este cultivo.

1.2. Hipótesis

Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

1. Para la aplicación de electroterapia a material vegetal de propagación, es posible el diseño y la fabricación del equipo adecuado y necesario, de manera tal que no cause daños al material tratado.
2. Por ser un cultivo propagado normalmente en forma asexual, clones de ajo que se establecen en el estado de Nuevo León están infectados por los virus OYDV y LYSV.
3. El tratamiento con corriente eléctrica permite la sobrevivencia de dientes de ajo, por lo que puede ser utilizado como pretratamiento en la eliminación de virus que infectan este cultivo.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. Importancia del cultivo

2.1.1. Importancia económica

El ajo (*Allium sativum* L.) es producido en 21 estados de la república mexicana; en el año agrícola 1993 se sembraron 7568 hectáreas para una producción de 52,196 toneladas, el promedio nacional de rendimiento fue de 6.89 ton /ha, el precio medio rural estuvo en los 2,598.18 pesos la tonelada y el valor de la producción total fue de 135,614,685 pesos. Los principales estados productores son Guanajuato, Zacatecas y Aguascalientes. En el estado de Nuevo León se sembraron 226 hectáreas para una producción de 628 toneladas, ocupando así el noveno lugar en superficie sembrada y el octavo en producción (INEGI, 1997). El estado de Guanajuato es el principal productor de ajo en nuestro país, sembrando anualmente de 3,000 a 6,000 hectáreas, con una producción aproximada de 40,000 toneladas, representando el 60% de la producción nacional (Pérez *et al.*, 1996).

2.1.2. Importancia medicinal y alimenticia

El ajo constituye un cultivo de importancia económica al ser utilizado como condimento y por sus propiedades medicinales; Cárdenas (1995) y Hornedo (1987), mencionan que el ajo puede ser usado para tratar una gran diversidad de enfermedades.

La aliina proporciona el sabor del ajo crudo y la alicina su aroma característico (García, 1990); su composición nutritiva difiere según la variedad elegida para el análisis, como ejemplo se presenta el cuadro 2.1.

En 1991 el consumo per-capita de ajo fue de 402 gramos (Gómez *et al.*, 1991). Es un condimento imprescindible en la cocina ya sea natural o industrializado, además, existe la feria mundial del ajo en Gilroy, California donde pueden encontrarse una serie de productos hechos a base de ajos, incluso nieve, vino, fijadores y hasta perfumes (Hornedo, 1987).

Cuadro 2.1. Composición nutritiva de diferentes variedades de ajo (García, 1990).

Compuesto	Fersini	Yamaguchi	Japón	Unidades
Desperdicios	—	20	—	gr
agua	61	61	63	gr
proteínas	4	6.4	6.7	gr
Lípidos y grasas	0.5	0.5	0.1-0.2	gr
Glúcidos	20	2.9	28	gr
Celulosa	—	—	1	gr
Vitamina B1	0.2	0.2	18-21	mg
Vitamina B2	0.11	0.11	0.08	mg
Vitamina C	9-18	15	9-18	mg
Niacina	0.7	0.7	0.6	mg
Calcio	10-24	24	—	mg
Hierro	1.7-2.3	1.7	2.3	mg
Magnesio	—	32	—	mg
Fósforo	40-195	195	—	mg
Potasio	540	—	—	mg
Valor energético	98-139	100-139	—	Calorías

2.2. Problemas fitopatológicos del ajo

2.2.1. Bacterias

Las bacterias fitopatógenas afectan a casi todos los tipos de plantas y, bajo ciertas condiciones ambientales, pueden ser extremadamente destructivas (Agris, 1995); Provocan diversos tipos de enzimas, toxinas y otras sustancias que afectan a las plantas y producen síntomas como pudriciones blandas, marchitez, manchas foliares y otras (Fucikovsky, 1992). Entre las enfermedades bacterianas que infectan

el ajo, se tienen a la pudrición suave (*Erwinia carotovora* [L.R. Jones] Holland) (García, 1988) y otras de los géneros *Pseudomonas* y *Corynebacterium* (Fusikovsky, 1992).

2.2.2. Hongos

Se considera que más de 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas y cada uno de ellos atacan a varios tipos de plantas (Agrios, 1995). García (1988), Velázquez (1990), Laborde (1992), Mendoza (1992), Sobrino y Sobrino (1992) y Pérez *et al.* (1994), señalan que el ajo es afectado por las siguientes enfermedades fungosas: mancha púrpura (*Alternaria porri* [Ell] Cif), moho gris (*Botrytis allii* Munn), pudrición del bulbo (*Fusarium oxysporum* Schlecht), pudrición seca (*Helminthosporium allii* Camp), roya del ajo (*Puccinia allii*), pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), mildiú (*Perenospora destructor* [berk] Camp) y *Fusarium spp.*

2.2.3. Nematodos

Los nematodos fitoparásitos se caracterizan por tener un estilete (estomatoestilete u odontoestilete) que funciona como aguja hipodérmica substrayendo el contenido citoplásmico de las células del hospedante durante su alimentación (Zavaleta, 1992). La importancia de los nematodos como organismos fitopatógenos aumenta por ser también agentes transmisores de algunos virus y hongos (Agrios, 1995).

Los nematodos pueden provocar daños a tejidos superficiales o bien, al interior de las raíces u otros tejidos. Algunas formas parasitan de ambas maneras. Pueden atacar raíces, bulbos, tallos, hojas o yemas; llegan a ocasionar agallas, amarillamiento, achaparramiento o decaimientos que en ocasiones se piensa que se deben a otras causas (García, 1988).

García (1988) y Zavaleta (1992), señalan que los géneros de nematodos que causan daño en ajo son: *Aphelenchoides*, *Ditylenchus* (en especial *D. dipsaci*, que ocasiona el marchitamiento y muerte de epidermis del ajo), *Dorilaymus* y *Globodera*.

2.2.4. Virus

Los virus son patógenos obligados completamente dependientes de los constituyentes y moléculas celulares para su propia síntesis. Sus formas y tamaños son muy diversos, a menudo se describen como varillas rígidas y filamentos ondulados, en forma de bacilo o esféricos. tanto isométricos como poliédricos (Dunez, 1987; Agrios, 1995).

2.2.4.1. Importancia de los virus

Las enfermedades de origen viral han causado pérdidas importantes en la producción agrícola mundial, se ha llegado a perder de un 70 a un 100% de rendimiento en cultivos como papa, remolacha y frutales, en ocasiones el crecimiento no es afectado severamente ni el rendimiento disminuido, pero si demerita la calidad (Dunez, 1987).

Los virus provocan enfermedades que actualmente representan uno de los retos más serios e importantes en los sistemas de producción de las plantas cultivadas de México y el mundo (Úrias y Alejandre 1992). Su importancia e impacto radican en los siguientes puntos:

1. Reducen la producción y calidad de los cultivos.
2. Por la mezcla de los virus que se presentan en la naturaleza.
3. Por no contar con herramientas químicas para su combate o control.
4. Por lo difícil y caro que resulta el diagnóstico de estas enfermedades.
5. Por la facilidad de transmisión.

Quak (1977), cita varios ejemplos de comparación de rendimiento en calidad y cantidad entre plantas infectadas con virus y plantas libres de éstos; las últimas sobresalen favorablemente; en algunas especies vegetales a pesar de no presentar síntomas, se observan efectos favorables cuando se someten a un tratamiento para su saneamiento. Zaag (1987) considera que el número de generaciones que transcurren desde la infección, influye en la reducción del rendimiento; además, la progenie vegetativa de una planta que ha sido infectada por primera vez, puede producir mejor que la progenie de una planta

infectada una o más generaciones atrás. En cada generación los síntomas son más severos y menor el rendimiento.

2.3. Virosis del ajo

2.3.1. Antecedentes

Las especies cultivadas del género *Allium* están comúnmente infectadas con uno o más virus, especialmente cuando se propagan vegetativamente. Las enfermedades virales y los virus de importancia económica del género *Allium* se han estudiado en diversas partes del mundo desde el descubrimiento del onion yellow dwarf (OYDV) a principios de este siglo (Sherf y Macnab, s/a; Van Dijk, 1993b).

Conci *et al.* (1992), mencionan que en ajo, los virus con partículas filamentosas flexibles han sido reconocidos por muchos años. Estos virus parecen estar universalmente presentes en cultivos de ajo con excepción de los tratados por medio de cultivos de meristemos *in vitro*. Estudios con microscopía electrónica indican que el ajo propagado vegetativamente tiene complejos virales más que virus simples (Van dijk *et al.*, 1991).

Los virus OYDV, Leek yellow streak virus (LYSV) y el shallot latent virus (SLV) fueron los primeros virus caracterizados con antisueros disponibles. Al mismo tiempo, dos virus del mosaico del ajo (potyvirus) y un virus latente del ajo (carlavirus) se caracterizaron en Japón. El garlic yellow streak virus (GYSV) (potyvirus) se describió en Nueva Zelanda pero su identidad parece incierta (Bos *et al.*, Lee *et al.*, Abico *et al.*, y Mohamed y Young, citados por Van Dijk, 1993b)

Conci (1997), señala que el ajo es afectado por un complejo de virus causante de una enfermedad a la cual, por los síntomas que provoca, se le conoce como mosaico del ajo, enfermedad que se reporta en todas las zonas productoras del mundo.

Sutarya y Van Dijk (1994) reportan síntomas en todas las muestras de ajo del oeste y centro de Java. Por medio de ELISA, los asociaron con la presencia de OYDV-G y LYSV-G. Los porcentajes de plantas infectadas por los dos virus fue similar en las dos áreas y fueron en promedios de 87% y 19% para OYDV-G y LYSV-G respectivamente. Estos valores están en la misma magnitud de plantas de otras partes del mundo.

2.3.2. Virus que infectan el cultivo del ajo

El cultivo del ajo es afectado por diversas enfermedades virales tales como: onion yellow dwarf virus (OYDV), leek yellow streak virus (LYSV), garlic yellow streak virus (GYSV), garlic latent virus (GLV), garlic mosaic virus (GMV), narcissus latent virus (NLV), shallot mite-borne latent virus (SMbLV) (Courmet, 1992; Quak, 1977; Hernández y Ruiz, 1992; Graichen *et al.*, 1988; Conci *et al.*, 1992; Koch y Salomon, 1994; Yamashita y Oikawa, 1992; Van Dijk *et al.*, 1991).

Van Dijk (1993a, 1993b) identifica al OYDV (potyvirus) y al LYSV (potyvirus) que infectan ajo como razas distintas y específicas para esta especie, a las que clasifica como OYDV-G (potyvirus) y LYSV-G, (potyvirus) los cuales actúan en complejo. Clasifica a tres virus a los que llama garlic common latent virus (GCLV) (carlavirus), onion mite-borne latent virus (OMbLV) (carlavirus), así como a la raza ajo de shallot latent virus (SLV-G) (carlavirus); reporta además al arabis mosaic virus (AMV) (nepovirus), carnation latent virus (CLV) (carlavirus), narcissus latent virus (NLV) (carlavirus) y al tomato black ring virus (TBRV) (nepovirus).

Lot *et al.* (1994) reportan una enfermedad enanizante de ajo en el sureste de Francia a la que llamó garlic dwarf virus (GDV) y lo clasifica como una enfermedad semejante a reovirus y menciona que podría ser el primer informe de un reovirus afectando una monocotiledónea que no sea gramínea.

2.3.3. Importancia de los virus del ajo

Messaïen *et al.*, citado por Van Dijk, (1993b) informa de la prevalencia de los virus en cultivares de ajo de los cinco continentes. Koch y Salomon (1994), mencionan que el ajo por ser un cultivo que se propaga vegetativamente, todos los clones tradicionales están infectados con uno o más virus; Hernández y Ruiz (1992), ubican a las enfermedades virales como uno de los problemas del ajo en los países productores. Van Dijk (1993b) obtuvo valores de reacción positiva de 20 y 45% para el virus LYSV, mientras que para el OYDV fueron de 61% y 50% en muestras de ajo cultivado y silvestre respectivamente.

La incidencia depende mucho del método de muestreo, en muestras de ajo vendido para consumo las tasas de infección son cercanas al 100%. Las pruebas de muestras de selecciones de una compañía mejoradora, propagadas de plantas seleccionadas por apariencia sana, mostraron que plantas libres de OYDV-G pueden ocasionalmente encontrarse en ajos de muchos países (Van Dijk, 1993b).

Algunos virus, principalmente los potyvirus OYDV y LYSV, causan síntomas de mosaico en hojas infectadas y hasta un 35% de pérdida en el rendimiento. Otros virus, principalmente carla y rimovirus, están latentes en las hojas y dientes y no parecen afectar significativamente el rendimiento (Koch y Salomon, 1994).

Iwai *et al.* (1990), encontraron que de 189 clones de varias partes del mundo, 145 reaccionaron positivamente a los antisueros para GLV y OYDV. Solamente 12 reaccionaron únicamente para OYDV; Deng, *et al.* (1991), colectaron 1386 bulbos de ajo de mercados y campos de cultivo; por medio de la técnica de ELISA encontraron que 413 bulbos reaccionaron con anticuerpos para GLV; sin embargo, se detectó solamente en 146 hojas de 655 plantas desarrolladas en campo. Graichen *et al.* (1988), reportan que el cultivar thuringer de ajo infectado con OYDV y/o GLV, mostró reducciones significativas ($P < 0.05$) en peso del bulbo cuando estuvo infectado con ambos virus o con alguno de los dos. Matsubara *et al.* (1990), obtuvieron de bulbos derivados de dientes de ajo libres de virus un rendimiento de 93.5 g de dientes/bulbo, comparado contra un 64.4 g en bulbos procedentes de dientes infectados con virus. Walkey y Antill (1989) encontraron mayor peso y número de dientes en las cabezas de los grupos libres de virus que en los infectados. El número de dientes en algunos cultivares fue mayor en los grupos infectados que en los libres de virus, pero de un menor peso.

En países donde se han obtenido plantas libres de estos patógenos se reportaron aumentos en los rendimientos que varían entre 3 y 45% y entre 30 y 70% (Havranek, Marrou *et al.*, citados por Conci, 1991).

El OYDV es considerado la principal causa de síntomas de enfermedad en el complejo de virus infectando el cultivar Blanc de la Drôme; es causante de pérdidas de un 20 a un 30% en el rendimiento de cultivares franceses no especificados (Delecolle *et al.*, citados por Walkey y Antill, 1989).

La selección de plantas vigorosas de clones infectados, basada en la ausencia de, o una reducción en síntomas en las hojas, puede resultar en altos rendimientos de clones de cultivares específicos (Walkey y Antill, 1989).

2.3.4. Clasificación de los virus del ajo

De acuerdo con la caracterización hecha por Van Dijk (1993a, 1993b), los grupos taxonómicos de los virus que infectan especies de *Allium* son potyvirus, carlavirus y nepovirus. En el primer grupo están los virus que se conocen como más importantes que atacan ajo, el OYDV y el LYSV, ya que son reconocidos mundialmente, con mucha frecuencia están presentes en forma mezclada, por su grado de infectividad y por el daño económico que causan al cultivo.

2.3.5. Características de los virus del ajo

Los potyvirus constituyen un grupo muy grande de virus vegetales, a este grupo pertenecen los dos virus más importantes que atacan ajo, el OYDV y el LYSV (Sutarya y Van Dijk, 1994). Franki *et al.* (1985) los describen como partículas tipo varilla flexible de entre 680 y 900 nm de longitud y de aproximadamente 12 nm en diámetro. Cada partícula está construida con simetría helicoidal, de una especie simple de proteína de M_r entre 32 y 36×10^3 , encapsulando una molécula simple sensible positiva, ARN de filamento simple de M_r entre 3.0 y 3.5×10^6 . Los nepovirus son partículas isométricas de aproximadamente 30 nm, tienen forma polihédrica de una especie simple de proteína de M_r entre 55 a 60×10^3 , cubriendo una molécula de ARN de filamento doble de M_r entre 1.3 y 2.4 a 2.8×10^6 . Los carlavirus son varillas flexibles de 600 a 700 nm de largo por 13 de diámetro, de una especie simple de proteína de M_r de aproximadamente 32×10^3 , cubriendo una molécula de RNA de filamento sencillo de aproximadamente 2.7×10^6 .

2.3.6. Sintomatología causada por los virus del ajo

Nome (1987), indica que no todos los virus producen síntomas definidos en sus hospederos, por lo cual, en muchas circunstancias, las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar; en consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por la enfermedad no sean percibidas. Una moderada reducción del número o del tamaño de frutos, raíces o tubérculos, o la disminución de la vida productiva de la planta, probablemente no se aprecian o se atribuyen a factores ambientales o culturales, especialmente si todas las plantas del cultivo están infectadas de manera uniforme y no existen ejemplares sanos para compararlas.

Gibbs y Harrison (1976), señalan que los virus que no causan síntomas detectables o no provocan síntomas, pueden causar que plantas enfermas no sean eliminadas de un cultivo al tratar de realizar un control mecánico.

Los síntomas de plantas infectadas en un mismo campo van desde un estriado amarillo brillante hasta un ligero estriado. Estas diferencias en la severidad de los síntomas pueden deberse a las diferencias en virulencia (Sutarya y Van Dijk, 1994). Sherf y Macnab, (s/a) mencionan que las plantas infectadas con OYDV están severamente enanizadas, los tallos y hojas se tornan amarillas en grados variables, desde unas cuantas bandas hasta las hojas completas. Las hojas tienden a doblarse y arrugarse, lo que provoca una apariencia de planta enana. Los bulbos permanecen sólidos pero no alcanzan su tamaño completo.

En plantas indicadoras o diferenciales, es la variación de síntomas lo que ayuda a separar virus cuando están mezclados, los síntomas pueden ser desde lesiones ligeras hasta severas tanto locales como sistémicas. El TBRV y el ArMV causan reacciones severas en *Celosia argentea*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale* y *C. quinoa*. El SLV-G causa lesiones locales en *Celosia argentea* y *Chenopodium spp.* El SLV provoca lesiones locales en *C. amaranticolor* y *C. quinoa*. El GCLV ocasiona el desarrollo de lesiones necróticas o anillos verdosos con centro necrótico en *C. quinoa* y *C. murale*, sólo anillos verdosos en *C. amaranticolor*. Estos síntomas varían dependiendo de la especie en que se inoculen, la patogenicidad del virus o raza de virus y del aislamiento que se utilice (Van Dijk, 1993a; Cárdenas, 1992)

2.3.7. Transmisión de los virus

Se conocen varias maneras de dispersión además de la propagación asexual de material vegetal infectado; algunos virus pueden transmitirse por semilla o polen; los animales como los artrópodos y nematodos, y los hongos del suelo, sirven también como vectores de virus; aunque con menos frecuencia, la infección puede ocurrir por el contacto con herramientas a las plantas, incluso por el roce entre ellas. Estos modos de transmisión permiten la supervivencia del virus y su dispersión a cortas y medianas distancias. La dispersión a largas distancias ocurre por el movimiento mundial de material vegetal (Dunetz, 1987).

2.3.7.1. Transmisión por propagación vegetativa

Agrios (1995) señala que siempre que las plantas se propaguen vegetativamente, cualquier tipo de virus que exista en la planta madre, será transmitido a la progenie. Un principio de patología vegetal señala que las especies multiplicadas vegetativamente durante muchos años se infectan sistémicamente con uno o varios patógenos, en especial virus o agentes similares (Nyland, citado por Nome, 1987).

El ajo es una especie propagada vegetativamente, por tanto, es alta la probabilidad de que se encuentre infectado por alguno de los diversos virus que atacan liliáceas, excepto si es propagado por cultivo de meristemas (Walkey y Antill, 1989; Conci *et al.*, 1992; Salomon *et al.*, 1996).

2.3.7.2. Transmisión por semilla

En la semilla también pueden encontrarse virus que son transmitidos a las plantas; Vidales y Delgadillo (1987), encontraron por medio de ELISA que semillas de materiales genéticos de melón y pepino estaban contaminados por los virus del mosaico del pepino y mosaico de la calabaza. Se conoce que el OYDV y otros virus del ajo no se transmiten por esta vía (Smith, 1972)

2.3.7.3. Transmisión por insectos

Los áfidos son los principales agentes transmisores de los virus, Sherf y Macnab (s/a), señalan a *Myzus persicae* Sulz como el vector más eficiente de OYDV, seguido por *Schizaphis graminum* Rondani y *Rhopalosiphum padi*, aunque puede ser transmitido por 50 especies de áfidos diferentes (Drake *et al.*, citados por Smith, 1972). Sutarya y Van Dijk (1994) mencionan que aunque los áfidos transmiten de manera no persistente los virus en ajo, y a pesar de que no colonizan *Allium* en el campo, los áfidos alados son eficientes vectores de virus cuando se posan momentáneamente en el cultivo para alimentarse.

En el género *Allium*, el ácaro *Aceria tulipae*, es capaz de transmitir al onion mosaic virus (OMV), al GMV, además del OMbLV y del SMbLV; estos cuatro virus pertenecen al grupo de los carlavirus de la familia *Potyviridae* (Van Dijk, 1991). En ajo, *Aceria tulipae* se concentra en los ápices en crecimiento y en las brácteas (Otero, 1992).

2.3.7.4. Transmisión desde el suelo

Los virus ArMV y TBRV son transmitidos desde el suelo a especies de *Allium*; la infección por virus desde el suelo puede ser por hongos o nematodos (Van Dijk, 1993b; Otero, 1992; Mendoza, 1992).

2.3.8. Diagnóstico e identificación de virus

Cuando se investiga la identidad de un virus es importante determinar primero si es similar a alguno de los virus ya conocidos, esta es la fase de diagnóstico. En algunos casos con sólo conocer el síntoma que inducen, la morfología de la partícula, el tipo de inclusión viral y una prueba serológica es suficiente para ubicarlo en algún grupo de virus. Si no es posible colocarlo en alguno, se pasa a la fase de identificación o descriptiva, en la que se realizan todas las pruebas posibles para asegurarse que el virus es nuevo, establecer sus relaciones y publicar su descripción. Para la identificación de virus se utilizan diversas pruebas y observaciones como pueden ser hospedantes diferenciales, sintomatología, estabilidad del virus en la savia, serología o microscopía electrónica (Cárdenas, 1992).

2.3.8.1. Plantas indicadoras

Las plantas indicadoras ayudan en la identificación del virus por los síntomas que producen, o bien, usando plantas diferenciales es posible separar virus cuando se tienen mezclas (Cárdenas, 1992). Hernández y Ruiz (1990); Bruna *et al.* (1992) diagnosticaron virosis en ajo mediante plantas indicadoras, por su parte Van Dijk (1991, 1993a, 1993b) auxiliándose de plantas diferenciales aisló y caracterizó diversos virus y razas de éstos que atacan especies cultivadas y silvestres del género *Allium*.

2.3.8.2. Síntomas

Algunas plantas pueden no mostrar signos de infección, lo que hace necesario probar si las plantas son asintomáticas, si realmente están infectadas o si el virus está latente (Cárdenas, 1992). Los síntomas pueden observarse tanto en la especie de interés como en plantas indicadoras; existe una gran cantidad de éstas que se utilizan con este fin; algunas son silvestres y otras cultivadas, como las del género *Chenopodium* o algunas del género *Nicotiana*, pudiéndose usar incluso especies silvestres del mismo género de la especie de interés (Hernández *et al.*, 1992; Van Dijk, 1991; Cárdenas, 1992).

2.3.8.3. Inclusiones virales

El tipo de inclusión viral, localización, subestructura y composición química es útil para diagnóstico e identificación de los virus. Todos o la gran mayoría de virus dentro de un grupo taxonómico inducen el mismo tipo de inclusión, además, con las inclusiones se puede determinar si una infección viral es provocada por uno o más virus, ayudan a definir a éstos cuando la sintomatología observada en plantas en el campo es muy parecida y en algunos casos, también se puede llegar a identificar virus a nivel de grupo; por ejemplo el onion mosaic yellow virus (OYMV), en cebolla, forma inclusiones citoplasmáticas, amorfas y granuladas (Cárdenas, 1986, 1992).

2.3.8.4. Pruebas serológicas

La serología provee información específica y rápida con respecto a la presencia de los diferentes virus. Las pruebas serológicas existentes incluyen la microprecipitación, aglutinación de látex, inmunodifusión e inmunoabsorbencia con enzimas conjugadas (ELISA). Esta última es altamente sensible y específica; la prueba más utilizada, por su alta sensibilidad, es el doble sandwich de anticuerpos (ELISA), que permite evaluar un gran número de muestras simultáneamente en corto tiempo y mediante un procedimiento sencillo (Conci, 1991; Cárdenas, 1992).

2.3.8.5. Microscopía electrónica

La técnica de inmunomicroscopía es específica ya que se usa un anticuerpo para un virus específico, además facilita la observación de las partículas cuando se presentan en concentraciones bajas. El método consiste en cubrir las rejillas con el anticuerpo, después se pone la savia y al final se tinte con la tinción negativa (Baker *et al.*, citado por Cárdenas, 1992; Conci, 1991; Milne y Luisoni, 1976).

En el estudio de la virosis del ajo, la serología conjuntamente con la microscopía electrónica constituyen las herramientas de mayor utilidad en el diagnóstico. Se recomienda en un primer paso aplicar la técnica de ELISA y en una segunda etapa, las plantas detectadas como sanas, se estudian por inmunoelectro-microscopía (IEM) a fin de detectar la presencia de virus. Estas técnicas son una combinación de serología con la microscopía electrónica (Conci, 1991).

Walkey y Antill (1989), Conci y Nome (1992), Bruna *et al.* (1992), Van Dijk (1991, 1993a, 1993b), Sutarya y Van Dijk (1994), Lot *et al.* (1994), Koch y Salomon (1994), y Hernández, *et al.* (1995) usaron tanto la técnica ELISA como la inmuno microscopía electrónica para el diagnóstico de diversos virus en especies de *Allium* y en específico de ajo; Hernández *et al.* (1994) utilizaron una técnica a la que llama ultramicro-ELISA (UM-ELISA) para el diagnóstico de LYSV y OYDV, con la cual es posible optimizar el uso de los anticuerpos al ser requeridos en cantidades muy pequeñas.

2.3.8.6. Técnicas moleculares

Con las técnicas moleculares es posible estudiar los organismos a nivel de ADN, lo que ha permitido establecer marcadores moleculares que facilitan la separación y caracterización genética de los diferentes individuos. Estos marcadores se han utilizado para detectar cambios en genoma o para determinar la estructura de las poblaciones. Además, ayudan a clasificar a los individuos a nivel de especie, a conocer la dispersión de razas patógenas, e incluso permiten estudiar el origen y la evolución de aislamientos o razas dentro de una población, y facilitan la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos (Michelmore y Hulbert, Rosewich y McDonald, citados por Valverde y Paredes, 1996).

Nagakubo *et al.* (1994), Salomon *et al.* (1996), Tsuneyoshi y Sumi (1996) por medio de técnicas moleculares encontraron infecciones virales en ajo con virus miembros de los grupos *potyvirus* y *carlavirus* en forma mezclada y resaltan la importancia que puede tener la biología molecular en la identificación más específica y segura de los agentes causales de las enfermedades virales en esta especie.

2.3.9. Métodos de control de virus

El control de los virus vegetales ha estado basado principalmente en la prevención y prácticas de saneamiento, que son, producción y propagación de plantas libres de virus y la protección de las plantas contra la reinfección; estos esquemas de saneamiento para producción de plantas libres de virus han sido practicados por más de 30 años.(Dunez, 1987).

Sutarya y Van Dijk (1994) recomiendan coleccionar de cultivares locales plantas con pocos o ningún síntoma y propagarlos como grupos de plantación. Estas plantas de apariencia sana pueden también ser seleccionadas para propagarse por cultivo de meristemos; pudiera ser posible preservar la posibilidad de resistencia o tolerancia de los cultivares.

2.3.9.1. Quimioterapia

Por muchos años la quimioterapia se ha considerado un método con gran potencial pero, hasta ahora, los resultados no han sido favorables. Varios productos químicos han sido probados y de algunos se dice que inhiben la infección, pero ninguno es capaz de erradicar el virus de una planta infectada. La multiplicación de los virus disminuye cuando plantas infectadas son tratadas con análogos químicos de purina y pirimidina. Los intentos más recientes se han concentrado en el uso del virazole o ribavirin, un análogo de guanina, el producto ha tenido efecto sobre ciertos virus pero los resultados son inconsistentes (Dunez, 1987).

Pérez *et al.* (1996b) obtuvieron un 82% de plantas de ajo cultivar Taiwan con lectura negativa provenientes del cultivo de meristemos *in vitro* después de aplicación de termoterapia; mientras que del tratamiento con rivabirin sólo el 32.5% de las plantas presentaron lectura negativa.

2.3.9.2. Termoterapia y cultivo de meristemos *in vitro*

Los métodos de control de virus vegetales son principalmente: el tratamiento térmico, el cultivo de meristemos *in vitro* y la combinación de ambos; aunque existen otros que han sido utilizados pero no con la misma efectividad (Gibbs y harrison, 1976; Quak, 1977; Lozoya y Dawson, 1982).

El éxito de la terapia depende del virus a eliminar y de las características del material vegetal. La termoterapia es comúnmente efectiva sólo contra virus filamentosos e isométricos y contra enfermedades que se conocen son causadas por micoplasmas. Los cuatro pasos en las operaciones terapéuticas son: (1) Identificación del virus o los virus presentes en el clon. (2) Terapia. (3) Prueba a las plantas tratadas. (4) Propagación y pruebas continuas a las plantas saneadas bajo condiciones que eviten reinfección (Quak, 1977)

El tratamiento con agua caliente (50 a 55 °C), en general puede causar daños al tejido hospedero, la duración y la temperatura varía con el tipo de virus, su eficiencia es muy variable; el tratamiento con aire caliente (37 a 38 °C) por varias semanas disminuye el efecto de la elevación de la temperatura sobre el material vegetal y afecta la translocación y replicación de los virus. Se considera que no existe una

correlación entre el punto de inactivación termal (temperaturas altas) de los virus y la temperatura a la cual son eliminados por termoterapia (temperaturas menos altas); puede atribuirse a algún sistema metabólico que cambia el balance entre la síntesis viral y la pérdida de virus en la planta o al fracaso en la multiplicación del virus a esa temperatura (Quak, 1977).

Con excepciones, los virus no pueden ser eliminados totalmente de las plantas tratadas con termoterapia. Aunque el mecanismo de la termoterapia no está totalmente entendido, este afecta la replicación y translocación de los virus, sobre todo de la parte distal del brote desarrollado durante el tratamiento o de las yemas individuales; ambos son separados de la planta después del tratamiento y multiplicados por medio de cultivo de meristemos, o bien, usando microinjertos de los mismos ápices en estacas libres de virus. La proporción de plantas liberadas de virus después de la termoterapia y el cultivo de meristemos varía entre 5 y 85%; sin embargo, estas plantas contienen un bajo nivel de virus que generalmente son indetectables si las plantas son probadas después de la propagación, por lo que requieren ser probadas por varios ensayos sucesivos basados en métodos de detección sensibles (Dunez, 1987). Al disminuir la replicación y translocación del virus con la termoterapia, se facilita la obtención del meristemo al poder tomar uno más vigoroso, además aumenta la posibilidad de que se encuentre libre de virus (Quak, 1977; Gibbs y Harrison 1976).

Ding *et al.* (1988), utilizaron termoterapia, previo al cultivo de meristemos de bulbos de ajo infectados y obtuvieron una alta proporción de plantas libres del virus OYDV. Conci y Nome (1992) realizaron experimentos para encontrar la combinación letal de tiempo y temperatura con termoterapia a base de agua y aire en clones de ajo blanco. Las plantas obtenidas después del tratamiento con agua caliente se establecieron en cultivo de meristemos pero solamente el 13 % estuvo libre de virus. El tratamiento con aire caliente se hizo en cámara de crecimiento y en invernadero, a medida que se incrementó el tiempo en la cámara, disminuyó el porcentaje de regeneración a tan sólo un 10%, pero el porcentaje de plantas libres de virus fue del 100%, mientras que en invernadero fue del 33% la sanidad y del 73% la regeneración

2.3.9.3. Mejoramiento genético

La disponibilidad de nuevas tecnologías en biología molecular e ingeniería genética hace posible considerar nuevas opciones para el control de virus vegetales. Pueden involucrarse nuevas técnicas para introducir en las plantas genes específicos o códigos genéticos no solamente de plantas, sino también del genoma viral mismo (Dunez, 1987).

2.3.9.4. Electroterapia

El concepto puede definirse como el uso de la corriente eléctrica con fines terapéuticos. Se basa principalmente en los fenómenos provocados en los tejidos por el paso de la electricidad, es decir, en el calentamiento por el efecto joule y en la electrólisis. En la práctica se utilizan corrientes galvánicas, farádicas y alternas (Anónimo, 1979).

El principio de estos efectos se utiliza principalmente en la medicina humana; las corrientes galvánicas tienen un efecto analgésico sobre el sistema nervioso, provocan una activación de la circulación y de las funciones glandulares y un efecto electrolítico, las corrientes farádicas se usan en atrofias y parálisis musculares y las corrientes alternas de alta frecuencia tienen un efecto térmico que determina la vasodilatación y aumento del metabolismo de los tejidos afectados (Anónimo, 1979).

Otro principio utilizado es la marconiterapia que utiliza los efectos biológicos de las bandas hertzianas de onda corta; consisten en la formación de calor en el seno de los tejidos, de acuerdo con su constante dieléctrica, aunque no excluye acciones específicas, esto en consideración a la mayor constante dieléctrica de las células en relación a los líquidos intercelulares y, por tanto, el desarrollo esencialmente intracelular de calor (Salvat Mexicana de Ediciones, 1983).

2.4. La electroterapia en el control de virus vegetales

2.4.1. Concepto de corriente eléctrica

2.4.1.1. Concepto clásico

Comúnmente se define la corriente eléctrica como el flujo de cargas eléctricas a través de un conductor, desde los puntos de alto potencial a los de bajo potencial. Para que en un conductor se instale una corriente eléctrica, será necesario que dicho conductor tenga dos puntos por lo menos de potenciales diferentes (Soto, 1988; Holiday y Resnick, 1988).

2.4.1.2. Concepto en electrónica

Si las cargas eléctricas que se trasladan entre dos puntos de un conductor se les considera electrones (cargas negativas), el flujo de cargas eléctricas deberá ser desde el cuerpo de bajo potencial al cuerpo de alto potencial. A pesar que ambos conceptos se identifican y son equivalentes, ésta última objetiviza mejor los fenómenos que la misma comprende (Soto, 1988).

2.4.2. Clases de corriente eléctrica

Las clases de corrientes usuales son:

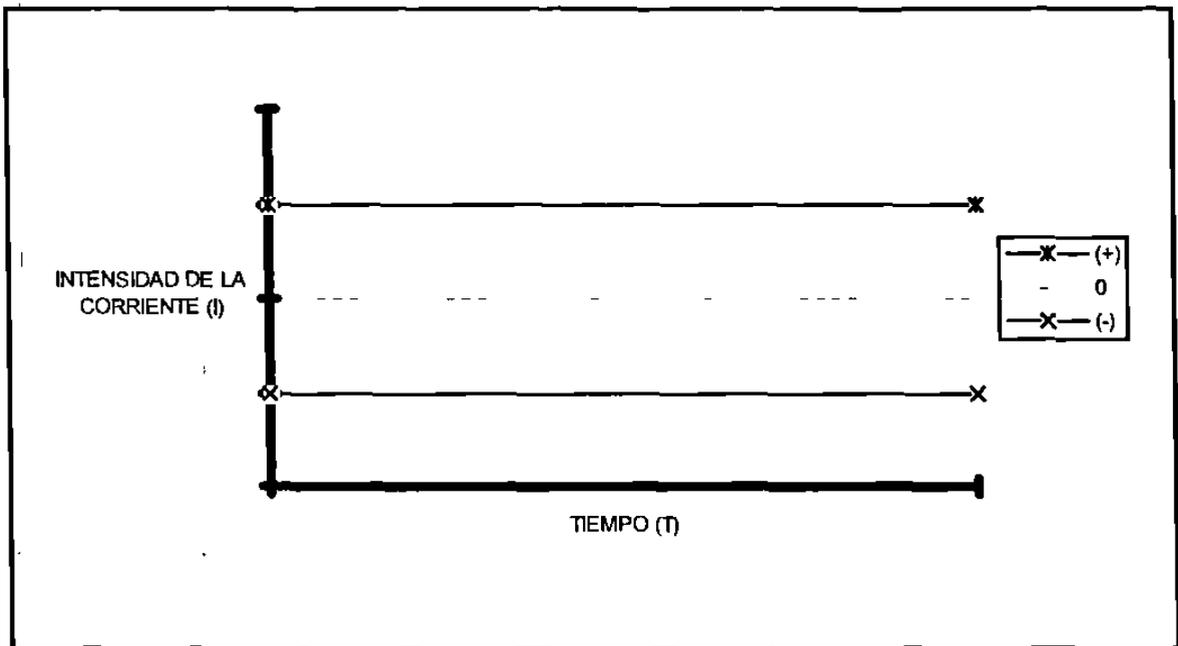
Corriente eléctrica directa: Constante y Variable.

Corriente eléctrica alterna: Sinusoidal y No sinusoidal.

2.4.2.1. Corriente eléctrica directa

Una corriente es directa cuando el flujo de cargas eléctricas no cambia de dirección con el tiempo; es directa continua cuando la intensidad I permanece constante en sentido y magnitud, y es directa variable porque tiene el mismo sentido y su magnitud varía (Soto, 1988; Holiday y Resnick, 1988) (figura 2.1).

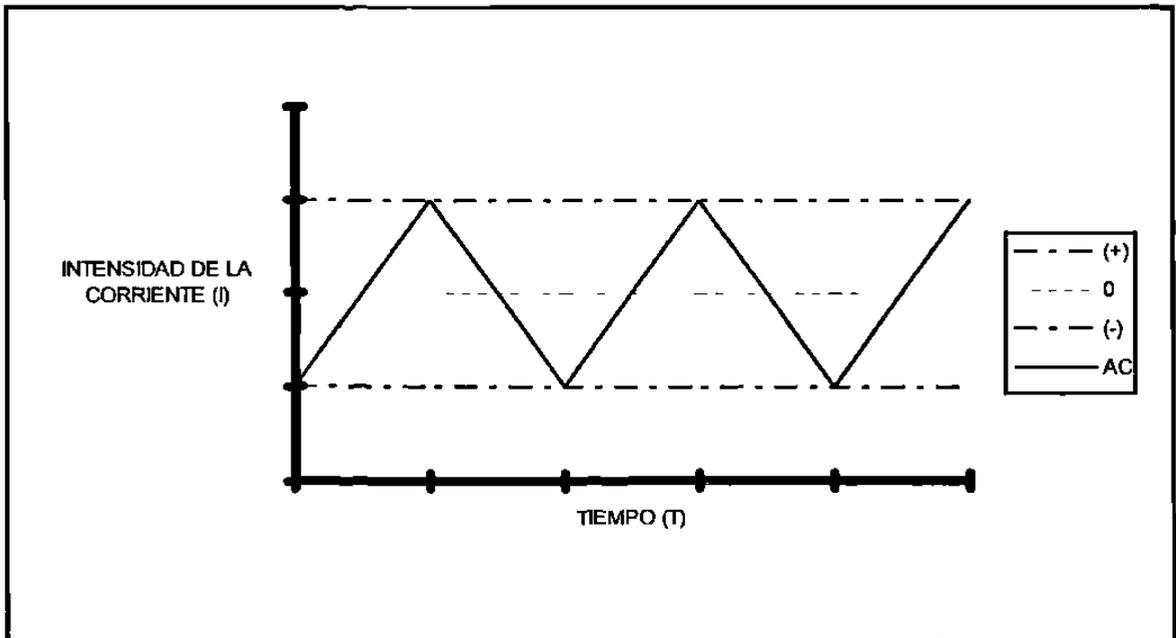
Figura 2.1. Representación gráfica de la corriente eléctrica directa.



2.4.2.2. Corriente eléctrica alterna

Una corriente es alterna cuando periódicamente cambia la dirección del flujo de cargas eléctricas; es alterna sinusoidal debido a que la intensidad de la corriente eléctrica unas veces es positiva y otras negativa, lo que se traduce en un cambio de flujo del sentido de cargas además, la intensidad varía según una senoide; es alterna no sinusoidal porque la intensidad varía en una forma diferente a ésta (Soto, 1988; Holiday y Resnick, 1988) (figura 2.2).

Figura 2.2. Representación gráfica de la corriente eléctrica alterna.



2.4.3. Ley de Ohm

Al aplicar a un conductor eléctrico una diferencia de potencial, se instala en el conductor una corriente eléctrica cuya intensidad es I . Al aumentar el valor del diferencial, aumenta el valor de la intensidad I y al disminuir el potencial igualmente disminuye la intensidad, comprobándose que entre la diferencia de potencial aplicado y la intensidad de la corriente existe proporcionalidad directa (Soto, 1988). Esta ley muestra que la resistencia es una función del flujo de corriente: $E=IR$ donde E es la diferencia de potencial eléctrico en volts (V), R es la resistencia en ohms (Ω) e I es el flujo de corriente en amperes (A). La conductividad eléctrica del tejido es expresada en mhos y es el recíproco de la resistencia eléctrica, $mho=1/R$ (Tattar y Blanchard, 1976; Holiday y Resnick. 1988).

2.4.4. Resistencia eléctrica

Es la resistencia de un conductor eléctrico, al que aplicando una diferencia de potencial de un volt, instala en él una corriente eléctrica de un ampere de intensidad, la unidad se designa con el nombre de ohm (Remizov, 1987; Soto, 1988; Holiday y Resnick, 1988).

2.4.5. Asociación de resistencias eléctricas

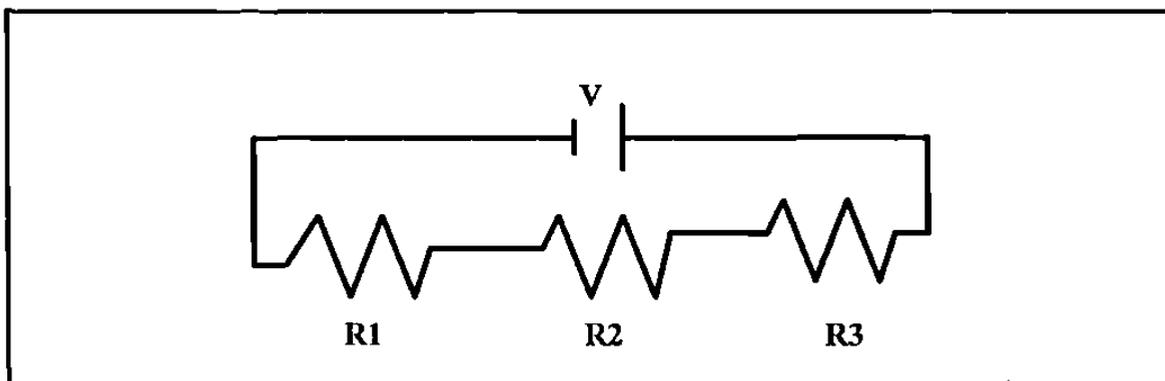
Las resistencias eléctricas se podrán asociar de tres maneras:

- En serie.
- En paralelo.
- Mixta.

2.4.5.1. Asociación de resistencias en serie

Varias resistencias R_1 , R_2 , R_3 se asocian en serie cuando el final de la primera resistencia se une al comienzo de la siguiente; el final de ésta con el comienzo de la tercera y así sucesivamente, por tanto, al aplicar una diferencia de potencial, se instala en el circuito una corriente de intensidad I que tendrá el mismo valor en todas las resistencias ya que el flujo de cargas eléctricas es continuo, sin acumulación de cargas en ninguna de las resistencias ni en sus uniones (Remizov, 1987; Soto, 1988) (figura 2.3).

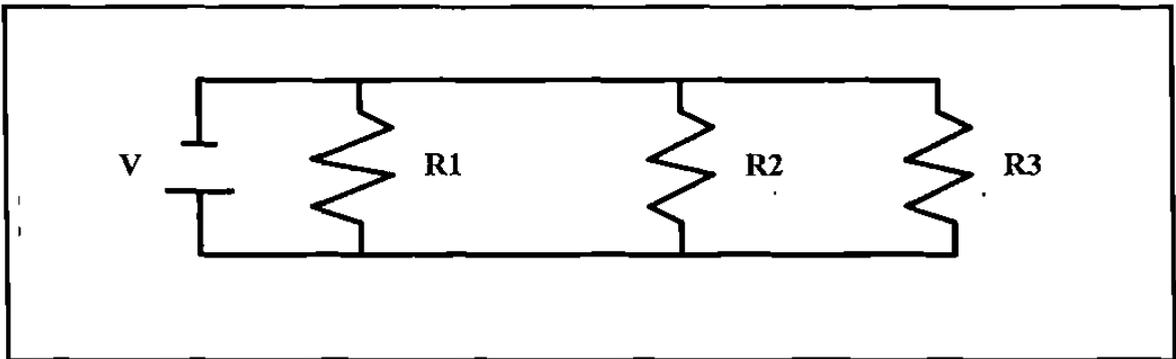
Figura 2.3. Asociación de resistencias en serie.



2.4.5.2. Asociación de resistencias en paralelo

Tres resistencias R_1 , R_2 y R_3 se asocian en paralelo cuando todas las primeras terminales de las resistencias se unen en un terminal común A y las segundas terminales en otro común B, de tal manera que aplicando entre A y B una diferencia de potencial ($V_A - V_B$) la corriente principal I se distribuye en las tres resistencias, instalándose en estas las corrientes derivadas I_1 , I_2 , I_3 . La diferencia de potencial es la misma para todas las resistencias R_1 , R_2 , R_3 (Remizov, 1987; Soto, 1988) (figura 2.4).

Figura 2.4. Asociación de resistencias en paralelo.



2.4.6. Efectos de las corrientes eléctricas sobre los tejidos

Los líquidos biológicos son electrolitos cuya conductibilidad eléctrica se asemeja a la de los metales. Los tejidos y órganos biológicos son formaciones bastante heterogéneas con diferentes resistencias eléctricas que pueden experimentar cambios por acción de la corriente eléctrica. Este hecho condiciona las dificultades de medición de la resistencia eléctrica tratándose de sistemas biológicos vivos (Remizov, 1987).

La conductibilidad eléctrica de los tejidos y de los órganos depende de sus estado funcional y por consiguiente, puede utilizarse como indicador de diagnóstico. Los tejidos de los organismos biológicos conducen tanto la corriente directa como la alterna. Las membranas biológicas y, por tanto todo el organismo, poseen propiedades capacitivas, en relación con ello, la impedancia de los tejidos del

organismo se determina tan sólo por la resistencia óhmica y por la capacitancia (Tattar y Blanchard, 1976).

La dependencia de la impedancia respecto a la frecuencia ofrece la posibilidad de evaluar la viabilidad de los tejidos de organismo. La diferencia entre las dependencias de la impedancia respecto a la frecuencia se advierte también en el tejido sano y enfermo; la impedancia de los tejidos y órganos depende así mismo de su estado fisiológico (Tattar y Blanchard, 1976; Remizov, 1987).

Todas las sustancias constan de moléculas y cada una de estas últimas representan un sistema de cargas. Esta es la razón por la cual el estado de los cuerpos depende substancialmente de las corrientes que fluyen por ellos y del campo electromagnético actuante. Las propiedades eléctricas de los cuerpos biológicos son más complejas que las de los objetos inanimados ya que el organismo es, además, un conjunto de iones con concentración variable en el espacio. El mecanismo primario de la acción de las corrientes y de los campos electromagnéticos sobre el organismo es físico (Tattar y Blanchard, 1976; Remizov, 1987).

Hayden *et al.* y Higinbotham, citados por Tattar y Blanchard, (1976) Mencionan que el paso de una corriente en una solución diluida como la que se encuentra en los tejidos vegetales es por el movimiento de los iones o electrolitos dentro y fuera de la célula. Una célula viva es selectivamente permeable a ciertos iones, manteniendo así una alta concentración dentro de la célula. Las diferencias en concentraciones iónicas dentro y fuera de las células frecuentemente resultan de diferencias en el potencial eléctrico que son activamente reducidas a través de las membranas vivas.

La membrana plasmática es una capa de lipoproteína y actúa como un aislante eléctrico de corrientes de baja frecuencia, las cuales aplicadas a tejidos pasan de célula a célula primeramente por medio de la pared celular y en fluidos dentro de los elementos conductivos. Así como la célula metaboliza normalmente, estas propiedades eléctricas pueden reflejar primeramente cambios en la tasa metabólica. Encima de los daños a la membrana, la depolarización o pérdida electrolítica puede ocurrir. Si los daños resultan en células muertas, como ocurre a menudo durante las interacciones parásito-hospedero, la emisión de electrolitos desde la célula dentro de los espacios intercelulares pueden causar un gran incremento local de concentraciones de iones; estos cambios en las concentraciones de iones intersticiales

pueden tener efectos pronunciados sobre las propiedades eléctricas del tejido afectado (Tattar y Blanchard, 1976).

Wagele, citado por Hernández (1996) señala que por medio de tratamiento con corriente eléctrica se estimula la regeneración de células y tejidos; Black *et al.*, citados por Tattar y Blanchard (1976) demostraron a través de una serie de experimentos una estimulación positiva del crecimiento de brotes; Guerrero (1978) reporta un mayor crecimiento en brotes de papa al hacer pasar un flujo de corriente a través del sustrato donde se encontraban establecidos.

2.4.6.1. Acción primaria de la corriente eléctrica directa

Los organismos, en una parte considerable, constan de líquidos biológicos que contienen un gran número de iones, los cuales participan en los diferentes procesos metabólicos. Por la acción del campo eléctrico los iones se mueven con distinta velocidad, se acumulan junto a las membranas celulares y forman un campo eléctrico inverso denominado campo de polarización. De este modo, la acción primaria de la corriente continua está relacionada con el movimiento de los iones, con la separación de ellos y la variación de su concentración en los diferentes elementos de los tejidos. Dependiendo de la intensidad de la corriente será la acción que se ejerza sobre el organismo; esta es la razón por la cual es de sustancial importancia la resistencia eléctrica de los tejidos (Remizov, 1987).

2.4.6.2. Acción primaria de la corriente eléctrica alterna

La acción de la corriente alterna sobre los organismos depende substancialmente de su frecuencia. Con frecuencias bajas, sonoras y ultrasonoras la corriente alterna al igual que la continua, ejerce sobre los tejidos biológicos una acción irritante. Esta circunstancia se debe al desplazamiento de los iones de las disoluciones de electrolitos, a la separación de ellos y a la variación de su concentración en las distintas partes de las células y de los espacios intercelulares. La irritación de los tejidos depende también de la forma de la corriente de impulsión, de la duración del impulso y de su amplitud (Remizov, 1987).

Para las frecuencias mayores de 500 kHz, el desplazamiento de los iones se hace conmensurablemente con el desplazamiento de ellos debido al movimiento térmico-molecular. Por consiguiente, la corriente o la onda electromagnética no darán lugar a la acción irritante; en este caso, como efecto primario fundamental interviene la acción térmica. El calor desprendido por los órganos depende de la permitividad de los tejidos, de su resistencia específica y de la frecuencia de las oscilaciones electromagnéticas. Para calentar los tejidos es necesario dejar pasar una corriente grande. La corriente continua o una corriente de frecuencia baja, sonora y hasta ultrasonora puede dar lugar a la electrólisis y a la destrucción del tejido. Esta es la razón por la cual para el calentamiento con corrientes se utilizan las de alta frecuencia (Remizov, 1987).

Los efectos térmicos que en un organismo producen las corrientes alternas en nada se diferencian de los que producen las corrientes continuas. La frecuencia de una corriente alterna, es el número de ciclos que ésta describe en la unidad de tiempo. Su unidad es el hertz o ciclo por segundo. Las corrientes eléctricas alternas usuales, oscilan entre 25 y 100 hertz y se les ha identificado como corrientes de baja frecuencia para diferenciarlas de las corrientes de alta frecuencia que son de algunos millares de hertz (Soto, 1988).

2.4.7. Electrodo

Los electrodos son conductores de forma especial que conectan el circuito con el sistema biológico, se emplean tanto para extraer las señales eléctricas y para garantizar una acción electromagnética exterior; deben cumplir varios requisitos: deben ser factibles de quitarlos y ponerlos con rapidez, deben tener una alta estabilidad de los parámetros eléctricos, ser resistentes mecánicamente, no crear interferencias, no irritar el tejido biológico, etc (Remizov, 1987).

Cuando los electrodos se usan en las investigaciones electrofisiológicas surgen dos problemas específicos. Uno de ellos es la aparición de fuerza electromotriz (F.E.M.) galvánica durante el contacto de los electrodos con el tejido biológico. Otro problema es la polarización electrolítica la cual se manifiesta en que al pasar la corriente sobre los electrodos se depositan productos de las reacciones. Como resultado

se engendra otra F.E.M. galvánica dirigida al encuentro de la F.E.M. principal. En ambos casos las F.E.M. deforman la señal bioeléctrica útil tomada por los electrodos. Lo anterior provoca errores importantes en las medidas que se llevan a cabo en electrofisiología. (Tattar y Blanchard, 1976; Remizov, 1987).

Para evitar la polarización puede usarse en el electrodo una solución de la sal del metal del que está construido, así no cambiará su naturaleza por el hecho de depositarse en éste los cationes de la sal disuelta. Para evitar alteraciones en los tejidos en los que se propone hacer mediciones, el contacto deberá establecerse por medio de una solución fisiológica, que como se sabe es una solución acuosa de cloruro de sodio con determinada titulación. Los electrodos hechos con acero inoxidable, plata, platino u oro disminuyen la polarización (Tattar y Blanchard, 1976; Soto, 1988).

Las reacciones químicas que se producen a lo largo del trayecto de la corriente eléctrica, modifican profundamente los tejidos, modificándose la resistencia eléctrica de por donde pasa la corriente; por tanto, no tiene sentido medir con precisión la resistencia eléctrica de los tejidos (Soto, 1988). La resistencia eléctrica del tejido está indirectamente relacionada con el área transversal del tejido y directamente con la distancia entre los electrodos; Por esta razón, las mediciones de resistencias pueden ser comparadas sólo cuando se tienen tipos iguales de electrodos, tejidos del mismo tamaño y distancias similares entre electrodos (Tattar y Blanchard, 1976).

2.4.8. Uso de las corrientes eléctricas en fitopatología

La técnica de la electroterapia no es muy conocida, sin embargo, Weiss (1922), menciona las corrientes de alta frecuencia como una posibilidad para lograr atenuar virus y bacterias.

El uso de las técnicas biofísicas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades está más enfocado hacia la medicina humana, y de estos se han adaptado para usarlos en la medicina veterinaria; comparativamente se ha desarrollado menos trabajo en estos aspectos en lo que se refiere a la aplicación de dichos tratamientos en plantas. Tattar y Blanchard (1976) hicieron una recopilación de investigaciones enfocadas hacia el uso de la electrofisiología en fitopatología, sobre todo en el uso de medidas de

diagnóstico eléctricas no destructivas, aunque también mencionan algunos resultados de los tratamientos con electricidad y su efecto sobre algunas enfermedades fungosas y virales.

Hoy en día el concepto de electrónica tiene una amplia difusión; como ciencia técnica se basa en primer término en los logros de la física. Sin vacilaciones se puede decir que actualmente sin aparatos electrónicos es imposible tanto el diagnóstico de las enfermedades, como su tratamiento (Remizov, 1987).

2.4.8.1. Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus

Quacquarelli, *et al.* (1980), utilizando la corriente eléctrica, lograron degradar partículas virales en preparaciones del virus mosaico del almendro (AMV) cuando se sometieron a un tratamiento de 10 o 100 mA durante dos minutos. Posteriormente trabajaron con varetas de almendro y las sometieron a una intensidad de 500 V de corriente eléctrica continua a diferentes tiempos. Un efecto benéfico del tratamiento se observó después de cinco minutos de aplicación de corriente y la inactivación del virus se alcanzó después de 20 minutos en varetas inmersas previamente en una solución de NaCl al 0.2%. Posteriormente realizaron otro experimento para calcular la resistencia del material vegetal obteniendo 17 megahoms/mm²/m en junio y 28 megahoms/mm²/m en septiembre. Los autores concluyen que independientemente de la duración del tratamiento y las condiciones de aplicación, el efecto de la electricidad en los virus parece estar muy relacionado con el incremento de temperatura, pero el calor producido por resistencia puede no haber sido el único factor responsable de la protección de varetas de almendro.

Guerrero (1978) buscando alternativas para eliminar el virus X de la papa (PVX) obtuvo una reducción del 33.55% ($P < 0.1$) en la concentración de virus en los folíolos inmersos en agua y tratados con una corriente de 3 a 4 V durante 15 minutos y no reporta daños en el material vegetal.

Lozoya *et al.* (1995), trabajando también con material infectado con PVX, aplicaron diferentes intensidades de corriente a distintos tiempos, posteriormente sembraron *in vitro* las yemas axilares de los tallos tratados. Al medir la eficiencia del tratamiento obtuvieron de un 40 a un 80% de regeneración de plántulas y de éstas, del 60 al 100% resultaron libres de virus con 15 mA durante cinco minutos.

Hernández *et al.* (1996), reportan porcentajes de saneamiento en caña de azúcar, para bacterias y virus, que van desde un 78% hasta un 100%, dependiendo del tratamiento eléctrico y de la variedad; estos tratamientos se hicieron previos al cultivo de ápices *in vitro*. Los autores mencionan las siguientes ventajas del método de electroterapia:

- Se acelera el crecimiento del material vegetal.
- Las vitroplantas llegan a tener tamaño y peso adecuado para hacer el diagnóstico de los patógenos más rápidamente.
- La regeneración del material tratado sufre menos daños y el porcentaje es igual o superior al material no tratado.
- Altos porcentajes de sanidad.
- Ahorro de energía al no ser necesario el uso de cámaras para termoterapia.

2.5. Inactivación térmica de los virus

Ginoza (1977) menciona que los virus pueden ser inactivados térmicamente por la desnaturalización de la cubierta de proteína, y quizá una estructura morfológica externa esté asociada con la adhesión e inyección, aunque el potencial de su ácido nucléico permanezca intacto. En otros casos, el ácido nucléico pudiera ser selectivamente inactivado, permaneciendo la cubierta de proteína intacta, lo cual puede ser aclarado comparando los rangos de pérdida de infectividad con los de la pérdida de antigenicidad. Esto se observa cuando el virus es inactivado bajo la temperatura a la cual se desnaturaliza la proteína. En otros casos, el ácido nucléico solo puede lograr entrar dentro de una célula y completar el ciclo infeccioso, aunque con menor eficiencia que el virus intacto. No puede hacerse una simple generalización de inactivación térmica, ya que la proteína, el ADN y el ARN tienen sus propios rangos de procesos de degradación y pérdidas de funciones.

Lozoya y Dawson (1982) usaron alternancia de temperatura para eliminar virus del cultivo de papa, mencionan que al incrementar a 40 °C la temperatura a la cual los virus se multiplican, la síntesis de ARN genómico viral cesó casi inmediatamente. Esto fue por comparación con una cesación similar de

síntomas de varias especies de ARN hospedero. En plantas que fueron reubicadas a 25 °C después de la incubación a 40 °C, la síntesis de ARN hospedero continuó inmediatamente. Estos autores opinan que con alternancia de temperatura se puede permitir el crecimiento de las plantas con una interrupción de la multiplicación viral.

Dawson *et al.* (1978) estudiaron el efecto de la termoterapia sobre la replicación de ácido ribonucleico (ARN) de cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), deducen que la incubación a 40 °C tuvo dos efectos sobre la síntesis de ARN viral; el efecto inmediato fue la inhibición de la síntesis de ARN del CCMV y un efecto más gradual fue la destrucción de la capacidad para la síntesis de ARN, debido a la disminución en la actividad de la enzima replicasa.

Smith (1972) y Sherf y Macnab (s/a) mencionan que el punto de inactivación térmica del OYDV es de 75 a 80 °C durante 10 minutos de exposición, el punto final de dilución es de 1:10,000 y la longevidad *in vitro* es de 100 horas a 29 °C; mientras que Conci (1991) señala que el punto de inactivación para los virus que infectan ajo está entre 55 y 65 °C y el punto de dilución final entre 1×10^3 y 1×10^5 .

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fases de la investigación

La presente investigación se realizó en tres fases, la primera correspondió al diseño y construcción del equipo necesario para la aplicación de los tratamientos con corriente eléctrica, así como la prueba del mismo en bulbo-semilla para determinar su sensibilidad a los tratamientos, esta primera fase se realizó en el Laboratorio de Física aplicada de la Facultad de Agronomía en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La segunda fase fue el diagnóstico de los virus OYDV y LYSV en dientes provenientes de bulbo-semilla de los clones de ajo proporcionados por el programa de producción de semilla de hortalizas de la FAUANL. Las pruebas serológicas se realizaron en el Laboratorio de Virología Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de General Terán, Nuevo León.

La tercera y última fase consistió en calcular el gasto de energía y la capacidad calorífica de los dientes de ajo en un clon determinado, esta etapa se realizó en el Laboratorio de Física Aplicada de la FAUANL.

3.2. Metodología desarrollada en cada fase

3.2.1. Primera fase: Diseño y construcción del equipo para la electroterapia y sensibilidad del material vegetal a los tratamientos

3.2.1.1. Diseño y construcción del equipo para la electroterapia

Para el diseño y la construcción del equipo se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- Disponibilidad de los materiales con que se construyó.
- Evitar la polarización.
- Tener un control sobre la corriente aplicada.
- Facilidad y rapidez en la toma de datos.

- Facilidad en la aplicación del tratamiento al material vegetal.

Tomando en cuenta estos aspectos se diseñaron y construyeron dos modelos por el Dr. Enrique Rosales Maldonado, en los cuales el autor de este trabajo colaboró.

3.2.1.1.1. Modelo uno. Los componentes con los que fue construido el modelo uno son los siguientes:

- Un transformador de 110 V A.C. a varios voltajes.
- Un variador de voltaje de 600 Watt para tener un control sobre los tratamientos a aplicar.
- Un interruptor solenoide para cambiar constantemente la polaridad de la corriente que sale del variador.
- Electrodo conectados en paralelo, contruidos con agujas y ordenadas sobre una placa para circuito impreso.

El funcionamiento del modelo uno es el siguiente: Con la corriente alterna se alimenta un eliminador de 110 a 12V; posteriormente se rectifica la corriente con diodos y un condensador para convertirla en corriente directa, que alimenta un motor de 12V para mover un platino que acciona un interruptor de solenoide para alternar la corriente que viene del variador de voltaje y evitar la polarización en la salida de la corriente.

Con el variador se regula el voltaje deseado en todas las salidas del transformador, en las cuales va conectado un voltímetro en paralelo para verificar el voltaje que se desee pasar a los electrodos; también está conectado un foco indicador en la misma posición.

Un miliamperímetro está conectado en serie en la línea de entrada de los electrodos y la otra a la salida del mismo, esto permite la lectura del consumo de corriente del material vegetal que se esté tratando. Los electrodos están hechos con agujas conectadas en paralelo sobre una placa para circuito impreso, la distancia entre las líneas de corriente es de 1.3 cm.

3.2.1.1.2. Modelo dos. Los componentes de este segundo equipo son:

- Un transformador de corriente de 110 V AC a varios voltaje con un límite superior de 800 volts, dependiendo de las combinaciones que se hagan entre cada una de las salidas.
- Un ventilador para enfriamiento del transformador.
- Electrodo planos de acero inoxidable para aplicar los tratamientos al material vegetal que permiten establecer la conexión en serie.
- Conexiones para cada uno de los multímetros utilizados.

El funcionamiento de este segundo modelo es el siguiente: con el transformador se eleva el voltaje desde 110 volts a varias salidas del mismo, dependiendo de la manera en que se combinen las líneas que de salida, que van conectadas a los electrodos planos en medio de los cuales se coloca el material vegetal a tratar, en estas mismas se conectan los multímetros que se utilizan para hacer las lecturas de voltaje aplicado y corriente consumida.

3.2.1.2. Evaluación de la sensibilidad del budo-semilla de clones de ajo a la corriente eléctrica

3.2.1.2.1. Preparación del material vegetal. Se colocaron los dientes de ajo en un recipiente con solución de NaCl al 0.2% más el fungicida ronylan a una dosis de 4 g/l durante una hora; el NaCl es con la finalidad de lograr una mejor conducción de la corriente eléctrica a través de los dientes.

3.2.1.2.2. Aplicación de la corriente eléctrica. Para evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre el material de propagación, el funcionamiento de ambos modelos, así como la sensibilidad de los diversos clones de ajo a la corriente eléctrica, se aplicaron tratamientos con cada uno de los modelos de los aparatos construidos. El primer modelo se utilizó sobre los clones Taiwan, Cadereyta y Aramberri y el segundo modelo con los clones Cadereyta, Aramberri y Blanco de Egipto.

Para estas evaluaciones se utilizaron 10 dientes de ajo para cada tratamiento, aplicándoseles diversos niveles de voltaje durante diferentes tiempos; en la primera evaluación se utilizó el modelo uno, y los niveles de voltaje aplicados fueron de 30, 40, 50, 60, 70 y 80 volts, semejante a una conexión en

paralelo entre los dientes tratados, durante 30, 60, 90, 120, 150, y 180 segundos. Los resultados obtenidos en esta primera evaluación se tomaron como base para aplicar los tratamientos con el segundo modelo que fueron formados aplicando niveles de 500, 685 y 800 volts, semejante a una conexión en serie entre los dientes tratados, durante 30, 60 y 90 segundos; en ambas pruebas se dejó como testigo un grupo de 10 dientes sin tratamiento alguno; la única variable medida en ambas evaluaciones fue el número de dientes brotados con cada tratamiento, los resultados se analizaron bajo un diseño de experimentos factoriales con una repetición (Olivares, 1996).

3.2.2. Segunda fase: Diagnóstico de los virus OYDV y LYSV

Se tomaron tres plantas completas de cada uno de los clones establecidos en campo por el Programa de Producción de Semillas de Hortalizas de la FAUANL, las cuales presentaban síntomas visuales de enfermedades virales, de dichas plantas se tomaron muestras de hoja y se sometieron a una prueba de E.L.I.S.A. para verificar la presencia de los virus OYDV y LYSV con los anticuerpos y los conjugados correspondientes, así como con una mezcla de anticuerpos con la que se pueden detectar cualquiera de los dos virus. Los anticuerpos, los testigos positivos y el protocolo a seguir para la realización de los análisis, fueron proporcionados por la Dra. Vilma C. Conci del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA).

El diagnóstico se realizó únicamente por observación de síntomas en las plantas seleccionadas y por tinción en las celdas de las placas de ELISA al adicionar el buffer de substratos. Se utilizaron placas individuales para los anticuerpos y anticuerpos conjugados de los virus OYDV, LYSV y la mezcla de estos. Al observar la tinción en la placa, se hizo la comparación visual con el testigo positivo de cada uno de los virus mencionados; en la placa utilizada para la mezcla, se colocaron ambos testigos positivos.

3.2.2.1. Protocolo de Doble Sandwich de Anticuerpos-ELISA seguido con los anticuerpos utilizados

Sensibilización de la placa. Diluir la Ig a la dilución de empleo (determinada en una placa de calibración) con el buffer de cobertura. Colocar 200 µl de esa dilución en cada celdilla. Cubrir la placa con polietileno para evitar deshidrataciones e incubar durante cuatro horas a 37 °C.

Lavado de la placa. Vaciar la placa, luego llenar las celdillas con buffer de lavado, dejar reposar tres minutos y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres veces.

Preparación y agregado del antígeno. Se maceran las muestras con Buffer de extracción en una relación p/v de 1/5. Conservar a 4 °C hasta su utilización. Luego de lavada la placa llenar las celdillas con 180 µl de cada muestra. Mantener la placa a 4 °C durante 16 a 18 horas (toda la noche).

Lavado de la placa. lavar la placa de la manera ya descrita hasta que no se observen los restos vegetales (tres o más lavados) y en forma cuidadosa para evitar que el contenido de una celdilla pase a otra.

Agregado del conjugado enzimático. Diluir el conjugado, según la concentración previamente determinada (dilución de empleo), en buffer de conjugados. Agregar 180 µl de esta dilución por celdilla. Cubrir con polietileno la placa para evitar deshidrataciones e incubar durante cuatro horas a 37 °C.

Lavar la placa como se describió, con la variante que el último lavado de este paso se realiza con buffer de sustrato.

Adición del sustrato. En el buffer de extracción disolver entre 0.6 a 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato y colocar 200 µl en cada celdilla de la placa.

hacer la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (A_{405}).

Las diluciones empleadas con los anticuerpos y los conjugados utilizados fueron las siguientes:

Virus	Ig	Conjugado
OYDV	1:4000	1:4000
LYSV	1:2000	1:2000
Mezcla	1:1000	1:1000

3.2.2.2. Reactivos necesarios en la preparación de los buffers para realización del DAS-ELISA

Buffer fosfato salino (PBS) en g/l:

ClNa	8
KH ₂ PO ₄	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.15
KCl	0.2
NaN ₃	0.2

Llevar a pH 6.8

Buffer de lavado:

(PBS + 0.5 ml/l de tween 20)

Buffer de cobertura:

Na ₂ Ca ₃	1.59
NaHCO ₃	2.93
NaN ₃	0.2

Llevar a pH 9.6

Buffer de extracción:

PBS + 0.5 ml/l de tween 20 + 20 g/l de polivinilpirrolidone (PVP) + 2% de leche en polvo descremada.

Buffer de conjugado:

PBS + 0.5 ml/l de tween 20 + 20 g/l de PVP + 2 g/l de ovoalbúmina + 2% de leche en polvo descremada.

Buffer de sustrato:

Dietanolamina	97 ml/l
H ₂ O	800 ml/l
NaN ₃	0.2 g/l
Llevar a pH 9.8	

3.2.3. Tercera fase: Gasto de energía y determinación de la capacidad calorífica del ajo**3.2.3.1. Aplicación de la corriente eléctrica**

Para esta última fase se utilizó el clon Cadereyta, se preparó el material tratándolo con solución salina al 0.2% más el fungicida ronylan a una dosis de 4 g/l, utilizándose para esta prueba el segundo modelo.

Para la aplicación de los tratamientos con corriente eléctrica, los dientes seleccionados se colocaron en serie en medio de dos electrodos de acero inoxidable, separando cada diente con una placa circular de metal para asegurar la conexión en serie y permitir la conducción de la corriente; con los multímetros se midieron la intensidad de la corriente que consumió el material vegetal y los niveles de voltaje aplicado que fueron de 500, 685 y 800 volts. Los tiempos de aplicación de 30, 60 y 90 segundos se manejaron con un cronómetro, encendiendo y apagando el aparato según el tiempo determinado. Conforme avanzaba el tiempo se tomaron cada diez segundos datos de consumo de corriente en mA y del nivel del voltaje aplicado. La temperatura del material vegetal se midió antes y después de los tratamientos con un termómetro digital (LI COR) cuyo sensor es a base de termopar Tipo J de constantan-cobre. Con los datos generados se calculó la energía empleada en cada tratamiento y se determinó la capacidad calorífica de los dientes de ajo utilizados.

3.2.3.2. Brotación del material vegetal

Después de la aplicación de los tratamientos con corriente eléctrica, los dientes se colocaron por separado en una charola de germinación, ubicando en una misma línea los que habían recibido el mismo tratamiento, marcando en un croquis su posición en la charola y su número de identificación. La charola con los dientes de ajo tratados se mantuvo a una temperatura de 25 °C para estimular la brotación de hojas. En este experimento se evaluó también el número de dientes brotados en cada tratamiento.

3.2.3.3. Cálculo de la energía utilizada durante la aplicación de los tratamientos

El cálculo del gasto de energía se realizó por medio de la fórmula propuesta por Holliday y Resnick (1988), la cual se explica de la siguiente manera:

Uno de los efectos de la corriente eléctrica es el efecto térmico de la corriente, el desprendimiento de calor (como energía) por unidad de tiempo, representado generalmente por la letra Q , es directamente proporcional a la segunda potencia de la intensidad de la corriente, es decir

$$Q=RI^2$$

donde:

Q = La disipación de la potencia en watt, unidades en las cuales se expresará el gasto de energía.

R = La resistencia como el factor de proporcionalidad.

I = Intensidad de la corriente.

3.2.3.4. Determinación de la capacidad calorífica específica de los dientes de ajo

La capacidad calorífica de los dientes de ajo se obtiene con la fórmula Holliday y Resnick (1988):

$$Q = mc(t - t_0)$$

donde:

Q = Energía aplicada, obtenida con la fórmula para calcular el gasto de energía, sus unidades son watt y al multiplicarlos por el tiempo se transforman en joules por segundo, los cuales se multiplican por **0.239** para obtener su equivalente en calorías.

m = masa en gramos del cuerpo sobre el cual se aplica la energía.

c = capacidad calorífica del cuerpo sobre el cual se aplica la energía en cal/ g °C.

t = temperatura final en °C.

t_o = temperatura inicial en °C.

Sustituyendo **c** en la fórmula se tiene lo siguiente:

$$c = Q / \{m (t - t_o)\}.$$

donde **c** está expresada en cal/g °C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Primera fase: Diseño y construcción del equipo para la aplicación de la electroterapia y sensibilidad del material vegetal a los tratamientos

4.1.1. Diseño y construcción del equipo para la aplicación de la electroterapia

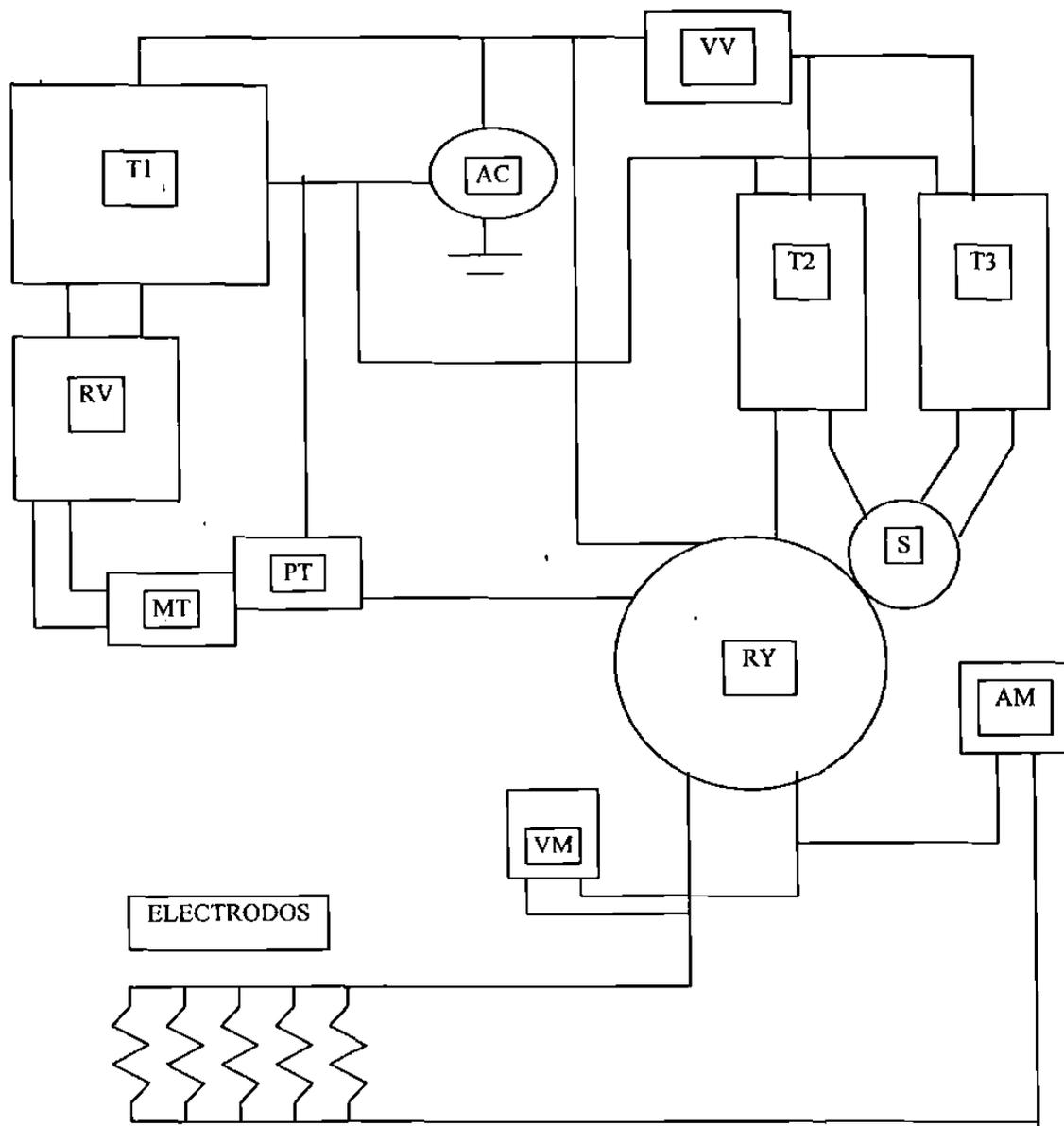
4.1.1.1. Modelo uno

Los componentes con los que fue construido el modelo uno se ordenaron como se ilustra en la figura 4.1. Este equipo presentó algunas deficiencias, tales como la polaridad ocasionada por el variador de voltaje que no pudo ser eliminada totalmente, y con la alternancia provocada con el interruptor solenoide se generaba variación en el voltaje aplicado; la conexión en paralelo de los electrodos dificultaba la toma de datos en las variables deseadas sobre el material vegetal, además de daños físicos al mismo por ser tales electrodos a base de agujas.

4.1.1.2. Modelo dos

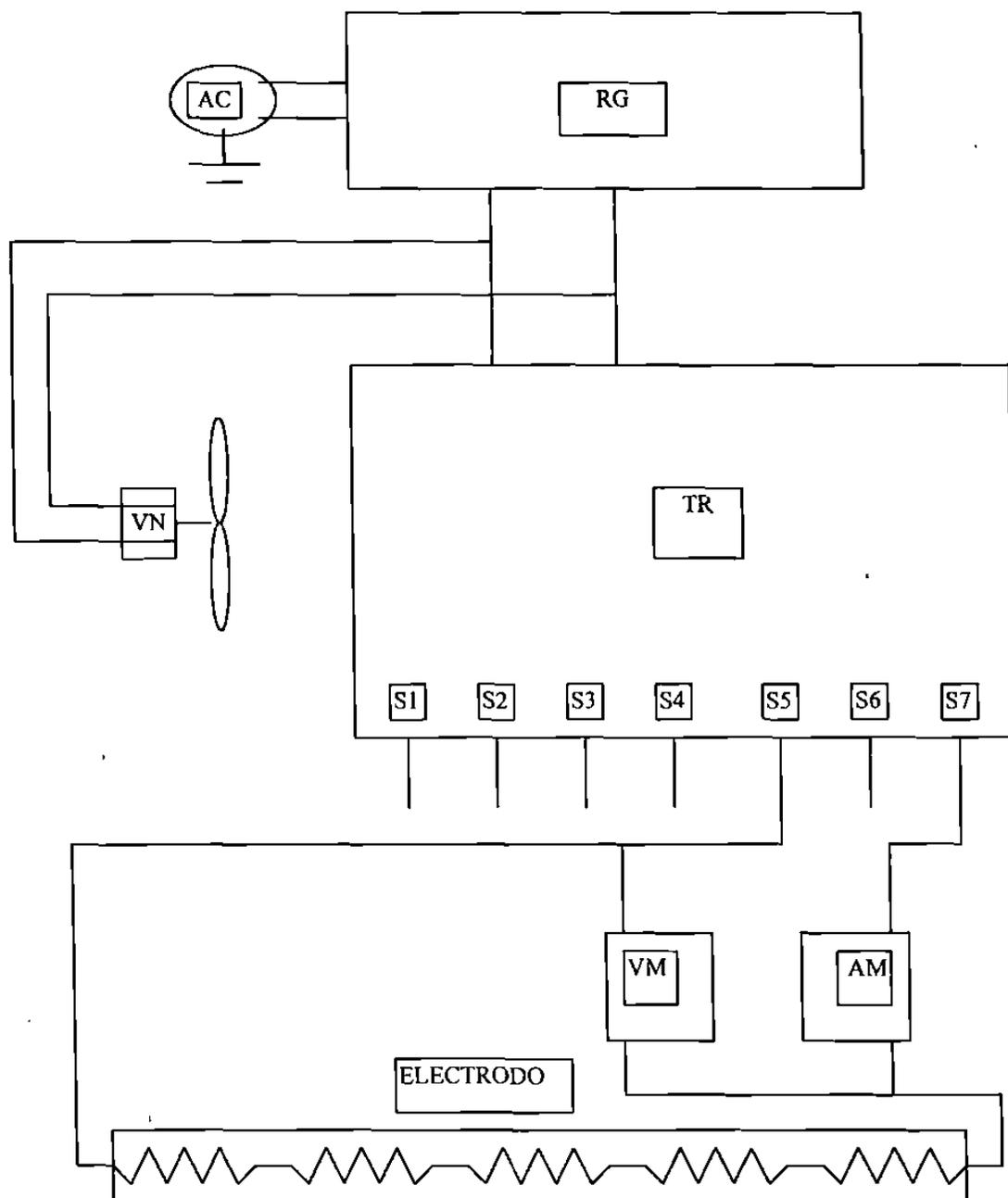
El modelo dos se construyó con la finalidad de corregir las deficiencias mencionadas del modelo uno; con este modelo se tiene más precisión en la toma de datos por tener una conexión en serie, se elimina totalmente la polaridad, se aplica un voltaje estable y no hay daño por heridas al bulbo-semilla, aunque se depende de las salidas de voltaje que el transformador tiene establecidas al no poder ajustarlas con la precisión deseada. El ordenamiento de los componente de este modelo pueden verse en la figura 4.2.

Figura 4.1. Esquema de los componentes del modelo uno del equipo para aplicar electroterapia a material vegetal.



VV=Variador de voltaje, T1=Transformador de 110V a 12 V, T2=Transformador de 110V a 250V, T3=Transformador de 110V a 500V, AC=Corriente alterna, RV=Rectificador de voltaje, MT=Motor de 12 V DC, PT=Platino, S=Selector de 3 posiciones, RY=Relay, AM=Amperímetro, VM=Voltmetro.

Figura 4.2. Esquema de los componentes del modelo dos del equipo para aplicar electroterapia a material vegetal.



AC=Corriente alterna de 110V, RG=Regulador de voltaje, VN=Ventilador, TR=Transformador, S1-S7=Salidas, VM=Voltímetro, AM=amperímetro

El modelo uno difiere con los trabajos de Lozoya *et al.* (1995), Quacquarelli *et al.* (1980) y Guerrero (1978) pues sólo utilizaron una fuente de voltaje, lo que se asemeja más al modelo dos ya descrito

Las dos diferencias claras que se tiene entre los modelos presentados con los trabajos de los autores citados, son que ellos no utilizan electrodos especiales como recomiendan Tattar y Blanchard (1976) y Remizov (1987) con la finalidad de disminuir la polarización y permitir una mejor conducción de la corriente hacia el material vegetal, ya que conectan las salidas de su fuente de voltaje directamente sobre el material que en su caso trataron; Lozoya *et al.* (1995), trataron tallos de papa, conectando las salidas de la fuente de poder directamente a los tallos, y Guerrero (1978) utilizó papel aluminio en medio de los cuales puso hojas también de papa; en cambio Quacquarelli *et al.* (1980), utilizaron electrodos de platino y en un primer experimento conectaron cada una de las salidas de su fuente de voltaje a un extremo de un trozo de manguera flexible lleno de solución salina, colocando las varetas en los extremos libres de las mangueras, mientras que en el segundo experimento conectaron los electrodos de platino directamente a las varetas de almendro. El problema de la polarización es que se origina por la acumulación de iones positivos o negativos, según la polaridad de la línea de salida de voltaje, lo que poco a poco dificulta el paso de corriente hacia el material a tratar.

La otra diferencia es que estos autores trabajaron con corriente directa (DC) mientras que los modelos aquí presentados generan corriente alterna (AC). Ambos tipos de corriente provocan efectos similares en cuanto a elevación de temperatura sin embargo, hay un efecto también por la frecuencia con que oscila la AC (Remizov, 1987 y Soto, 1988).

La ventaja de los trabajos presentados por los autores citados es que pudieron tener un control efectivo sobre el voltaje que desearon aplicar o bien, sobre la corriente en mA que el material debía consumir; esto puede lograrse con la fuente de voltaje adecuada, tanto con AC como con DC, aunque con esta última es recomendable utilizar los electrodos apropiados para disminuir los efectos de la polarización.

La conexión en serie permitió tratar varios dientes a la vez y facilitó el trabajo al poder tomar una sola vez y cada determinado tiempo los valores de corriente y voltaje del material vegetal, lo anterior sería

más difícil si hubiera estado en paralelo, pues se tendrían que tomar los datos en cada uno de los dientes de ajo, lo que originaría un mayor error experimental además, por cuestiones prácticas, el manejo es más sencillo con una conexión en serie, sobre todo para la construcción de un montaje que permita aplicar la corriente eléctrica en forma homogénea a cada unidad de material vegetal.

4.1.2. Evaluación de la sensibilidad del bulbo-semilla de clones de ajo a la corriente eléctrica

4.1.2.1. Evaluación con el modelo uno

En el análisis de varianza presentado en el cuadro 4.1 se observa que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.01$) para las variables clon, voltaje y su interacción, mientras que no las hay para la variable tiempo ni para las interacciones clon*tiempo y tiempo*voltaje.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para el efecto del voltaje, tiempo y clon sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum* L) después de la aplicación de corriente eléctrica con el modelo uno.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. CALC.	P>F
Modelo estadístico	27	43669.44444	766.13060	3.04	0.0001**
Clon	2	5896.29630	2948.14815	11.69	0.0001**
Voltaje	5	11704.62963	2340.92593	9.28	0.0001**
Tiempo	5	1326.85185	265.37037	1.05	0.3978
Clon*voltaje	10	10059.25926	1005.92593	3.99	0.0005**
Clon*tiempo	10	2903.70370	290.37037	1.15	0.3450
Voltaje*tiempo	25	11778.70370	471.14815	1.87	0.0300*
Residual	50	12607.40741	252.14815		
Total	107	56276.85185			

C.V.= 22.53549. *Significativa con $P < 0.05$. ** Altamente significativa con $P < 0.01$

La comparación de medias se hizo mediante una prueba de Tukey y los resultados se presentan en el cuadro 4.2; se puede apreciar una clara diferencia entre los clones y una superioridad del clon

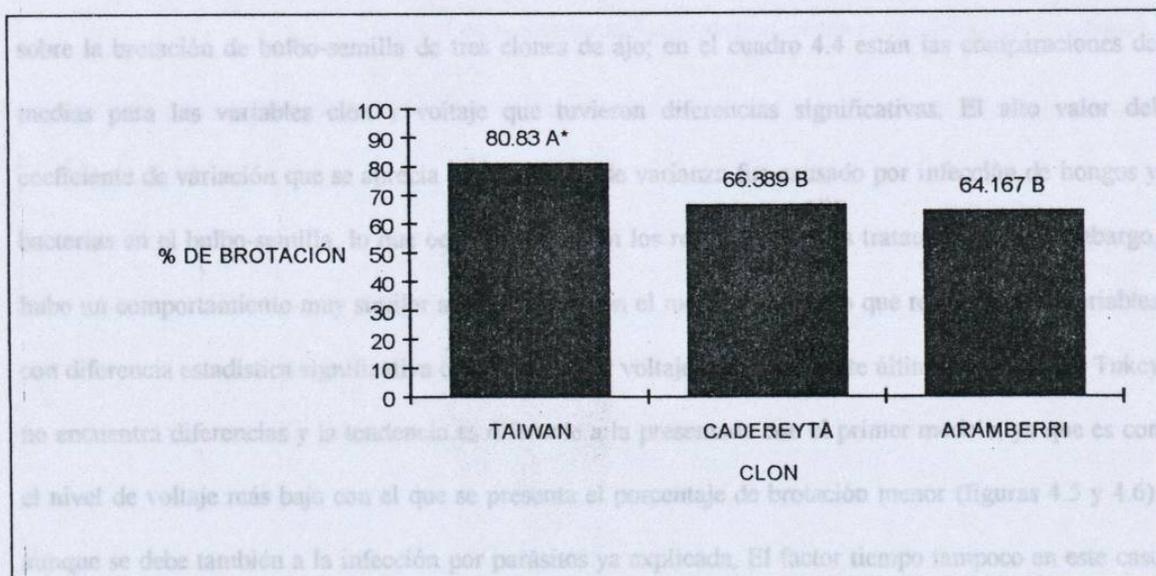
Taiwan sobre los regionales Cadereyta y Aramberri; igualmente se observa el efecto del voltaje sobre la brotación de los dientes de ajo, presentándose un porcentaje mayor a voltajes bajos disminuyéndose conforme se incrementa éste último; estas tendencias se pueden observar en las figuras 4.3 y 4.4.

Cuadro 4.2. Pruebas de comparación de medias (Tukey con $\alpha=0.05$) para las variables clon y voltaje en los tratamientos con corriente eléctrica aplicados con el modelo uno.

Clon	Media	Grupo Estadístico*	Voltaje	Media	Grupo Estadístico*
Taiwan	80.833	A	50V	82.778	A
Cadereyta	66.389	B	40V	82.222	A
Aramberri	64.167	B	30V	72.778	AB
			60V	70.000	ABC
			80V	60.556	BC
			70V	54.444	C

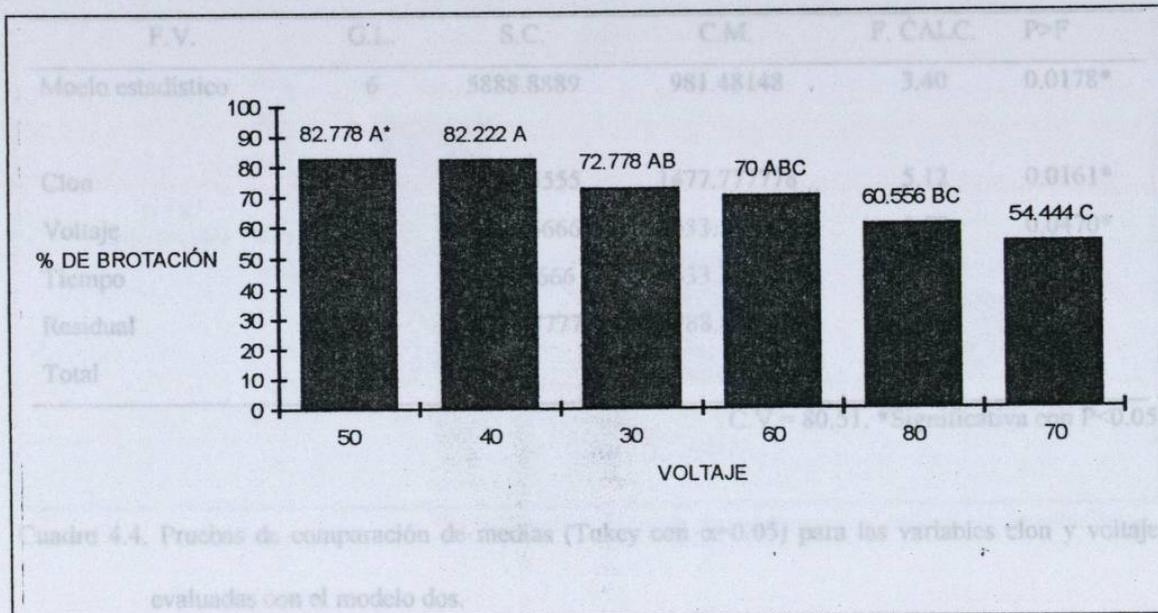
**Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

Figura 4.3. Tendencia del efecto del clon sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum* L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo uno.



*Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

Figura 4.4. Tendencia del efecto del voltaje sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum* L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo uno.



*Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

4.1.2.2. Evaluación del modelo dos

En el cuadro 4.3 se presenta el análisis de varianza que muestra los efectos de los tratamientos sobre la brotación de bulbo-semilla de tres clones de ajo; en el cuadro 4.4 están las comparaciones de medias para las variables clon y voltaje que tuvieron diferencias significativas. El alto valor del coeficiente de variación que se aprecia en el análisis de varianza fue causado por infección de hongos y bacterias en el bulbo-semilla, lo que ocasionó fallas en los resultados de los tratamientos. Sin embargo, hubo un comportamiento muy similar al presentado con el modelo uno en lo que respecta a las variables con diferencia estadística significativa como son clon y voltaje, aunque en este último la prueba de Tukey no encuentra diferencias y la tendencia es diferente a la presentada con el primer modelo, ya que es con el nivel de voltaje más bajo con el que se presenta el porcentaje de brotación menor (figuras 4.5 y 4.6), aunque se debe también a la infección por parásitos ya explicada. El factor tiempo tampoco en este caso presentó un efecto significativo, con periodos más largos o mayor número de niveles podrían observarse tales efectos.

Cuadro 4.3. Análisis de varianza para el efecto del voltaje, tiempo y clon sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum L*) después de la aplicación de corriente eléctrica con el modelo dos.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. CALC.	P>F
Moelo estadístico	6	5888.8889	981.48148	3.40	0.0178*
Clon	2	2955.5555	1477.77778	5.12	0.0161*
Voltaje	2	2066.6666	1033.33333	3.58	0.0470*
Tiempo	2	866.6666	433.33333	1.50	0.2472
Residual	20	5777.7777	288.88888		
Total	26				

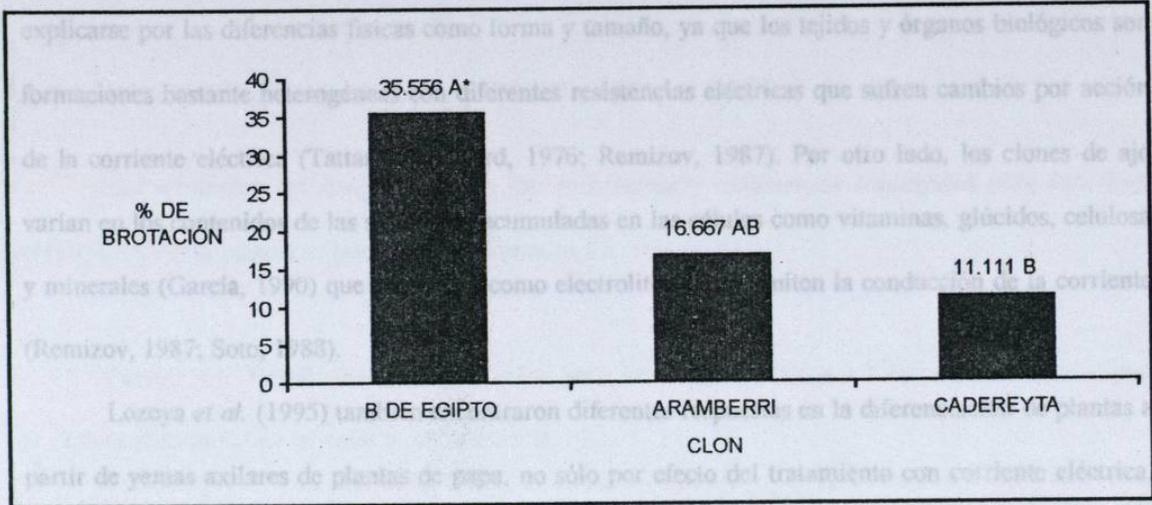
C.V. = 80.51. *Significativa con $P < 0.05$

Cuadro 4.4. Pruebas de comparación de medias (Tukey con $\alpha=0.05$) para las variables clon y voltaje evaluadas con el modelo dos.

Clon	Media	Grupo Estadístico*	Voltaje	Media	Grupo Estadístico*
B. de Egipto	35.556	A	685V	28.889	A
Aramberri	16.667	AB	800V	25.556	A
Cadereyta	11.111	B	515V	8.889	A

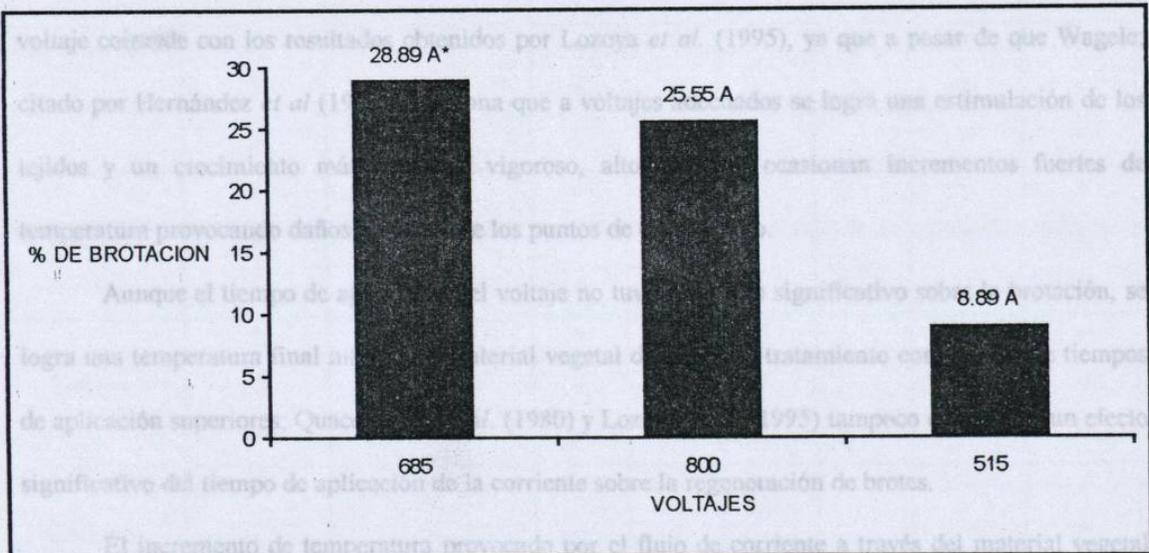
*Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

Figura 4.5. Tendencia del efecto del clon sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum* L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo dos. Los resultados pueden explicarse por las diferencias físicas como forma y tamaño, ya que los tejidos y órganos biológicos son formaciones bastante heterogéneas con diferentes resistencias eléctricas que sufren cambios por acción de la corriente eléctrica (Tattar et al., 1976; Remizov, 1987). Por otro lado, los clones de ajo varían en la acumulación de las sustancias acumuladas en ellos como vitaminas, glucidos, celulosos y minerales (García et al., 1980) que influyen en la conductividad eléctrica y en la conducción de corriente (Remizov, 1987; Sotoca, 1983).



*Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

Figura 4.6. Tendencia del efecto del voltaje sobre la brotación de dientes de ajo (*Allium sativum* L) después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica con el modelo dos. La influencia del voltaje en la brotación de los dientes de ajo por efecto del incremento del voltaje coincide con los resultados obtenidos por Lozoya et al. (1995), ya que a pesar de que Wagala citado por Hernández et al. (1980) afirma que a voltajes superiores se logra una estimulación de los tejidos y un crecimiento más vigoroso, altas voltajes ocasionan incrementos fuertes de temperatura provocando daños en los puntos de crecimiento.



*Letras iguales indican que pertenecen al mismo grupo estadístico.

La diferencia en la respuesta a los tratamientos con corriente eléctrica por los clones utilizados, algún tipo de daño a las células vegetales, aunque también pueden ser los causantes del estímulo de una evaluada a través del porcentaje de brotación, son similares al utilizar ambos modelos. En la evaluación

con el modelo uno, el clon Taiwán sobresale sobre los clones Cadereyta y Aramberri, mientras que con el modelo dos el clon Blanco de Egipto superó también a estos mismos clones. Los resultados pueden explicarse por las diferencias físicas como forma y tamaño, ya que los tejidos y órganos biológicos son formaciones bastante heterogéneas con diferentes resistencias eléctricas que sufren cambios por acción de la corriente eléctrica (Tattar y Blancard, 1976; Remizov, 1987). Por otro lado, los clones de ajo varían en los contenidos de las sustancias acumuladas en las células como vitaminas, glúcidos, celulosa y minerales (García, 1990) que funcionan como electrolitos que permiten la conducción de la corriente (Remizov, 1987; Soto, 1988).

Lozoya *et al.* (1995) también encontraron diferentes respuestas en la diferenciación de plantas a partir de yemas axilares de plantas de papa, no sólo por efecto del tratamiento con corriente eléctrica, sino también por efecto de los clones utilizados. De la misma manera Hernández *et al* (1996) reportan diferentes respuestas a la regeneración en dos diferentes clones de caña tratados previamente con corriente eléctrica.

La disminución del porcentaje de brotación de los dientes de ajo por efecto del incremento del voltaje coincide con los resultados obtenidos por Lozoya *et al.* (1995), ya que a pesar de que Wagele; citado por Hernández *et al* (1996) menciona que a voltajes adecuados se logra una estimulación de los tejidos y un crecimiento más rápido y vigoroso, altos voltajes ocasionan incrementos fuertes de temperatura provocando daños y muerte de los puntos de crecimiento.

Aunque el tiempo de aplicación del voltaje no tuvo un efecto significativo sobre la brotación, se logra una temperatura final mayor del material vegetal después del tratamiento con niveles de tiempos de aplicación superiores; Quacquarelli *et al.* (1980) y Lozoya *et al.* (1995) tampoco obtuvieron un efecto significativo del tiempo de aplicación de la corriente sobre la regeneración de brotes.

El incremento de temperatura provocado por el flujo de corriente a través del material vegetal está relacionado con la brotación del material vegetal, limitándolo en función de los niveles que esta alcancen; sin embargo, aspectos como la alternancia y la frecuencia de la corriente pudieran provocar algún tipo de daño a las células vegetales, aunque también pueden ser los causantes del estímulo de una

brotación de los puntos de crecimiento o regeneración más rápida de brotes a partir de explantes, así como de una mayor velocidad de crecimiento.

4.2. Segunda fase: diagnóstico de los virus OYDV y LYSV

Los resultados del diagnóstico con los anticuerpos y anticuerpos conjugados para los virus OYDV, LYSV y la mezcla se presentan en el cuadro 4.5.

Cuadro 4.5. Resultados del diagnóstico para los virus OYDV y LYSV con los anticuerpos respectivos para cada uno de estos y con la mezcla.

CLON	No. PLANTA	DIAGNÓSTICO**						
		EN CAMPO	LYSV		OYDV*		MEZCLA	
			R1	R2	R1	R2	R1	R2
Taiwan	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Taiwan Terán	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Cádereyta	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Celaya	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Chileno	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+

** El signo (+) indica síntomas visuales y reacción positiva en el análisis de ELISA.

El signo (-) indica reacción negativa en el análisis de ELISA.

† No hubo reacción del conjugado al adicionar el sustrato.

Cuadro 4.5. Resultados del diagnóstico para los virus OYDV y LYSV con los anticuerpos respectivos para cada uno de estos y con la mezcla.

CLON	No. PLANTA	DIAGNÓSTICO**						
		EN CAMPO	LYSV		OYDV*		MEZCLA	
			R1	R2	R1	R2	R1	R2
Massone	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	-			+	+
Náपुरi	1	+	+	-			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Vikingo I	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Vikingo II	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
Aramberri	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+
San Luis	1	+	+	+			+	+
	2	+	+	+			+	+
	3	+	+	+			+	+

En los resultados presentados en el cuadro anterior es importante aclarar que los valores de densidad óptica no son presentados debido a que fueron muy altos en comparación con los que normalmente se obtienen después de realizar una prueba de ELISA; además de lo anterior, las celdas en las cuales no se depositó muestra vegetal y sólo se adicionaron sustancias como buffer de extracción, PBS o agua simple, registraban valores de densidad óptica muy elevados aun cuando no había tinción por la reacción del conjugado con el sustrato; por tales motivos, se tomó la decisión de hacer el diagnóstico

** El signo (+) indica síntomas visuales y reacción positiva en el análisis de ELISA.

El signo (-) indica reacción negativa en el análisis de ELISA.

† No hubo reacción del conjugado al adicionar el sustrato.

únicamente con la coloración en las celdas donde se depositó muestra vegetal y su comparación con los testigos vegetales positivos.

Los altos valores de absorbancia pudieron deberse a la leche en polvo descremada que se agregó en el buffer de conjugados, pues a pesar que se hace esta recomendación en el protocolo, puede ocurrir que un exceso de residuos de ésta queden adheridos a la pared de las celdas a pesar de los lavados que se hacen después del proceso de incubación del anticuerpo conjugado, lo que provoca lecturas falsas de densidad óptica. Tal vez debió utilizarse una concentración de leche más baja a la indicada.

Los síntomas de las plantas seleccionadas en campo son similares a los reportados por Sherf y Macnab (s/a), Fukami *et al.* (1989), Fukami e Ishii (1991), Van Dijk (1993a) Sutarya y Van Dijk (1994) y Conci (1997) tales como síntomas de estriado y mosaico de ligero a severo llegando a unirse hasta formar grandes manchas en las hojas, desde muy claras hasta un amarillo intenso, enanismo en las plantas y desarrollo raquítico en tamaño.

Los resultados de la coloración en las celdas de la placa se observa con los anticuerpos para el virus LYSV, mientras que para el virus OYDV no hubo reacción debido, tal vez, a la baja concentración empleada, o bien por degradación de los anticuerpos; sin embargo, la mezcla de anticuerpos tuvo reacción positiva para todas las muestras vegetales analizadas. Con la mezcla se puede diagnosticar la presencia de alguno de los dos virus señalados anteriormente, aunque no es posible determinar cual de ellos.

La repetición dos en la placa de la muestra tres del clon Massone y uno del clon Nápuri, fueron negativas para LYSV pero positivas para la mezcla, lo que indica que pueden ser falsos negativos en la placa.

No puede determinarse que el virus OYDV está o no infectando las muestras vegetales analizadas debido a la falta de reacción en la placa; sin embargo, Conci *et al.* (1992) lo mencionan como reportado en todo el mundo donde se han hecho análisis para su detección; Hernández y Rufz (1992), Van Dijk (1993a) y Koch y Salomon (1994) señalan que los virus del ajo están siempre presentes en todo el mundo, con excepción de aquellas plantas obtenidas por cultivo de meristemos; mencionan también que los bulbos destinados al mercado pueden presentar tasas de infección de hasta un 100%. Iwai *et al.*

(1990) reporta 145 clones de un total de 189 de todo el mundo con reacción positiva para GLV y OYDV; esto indica que este último virus actúa generalmente en forma mezclada. Van Dijk, (1993b) lo reporta mezclado siempre con LYSV; Conci (1997) menciona que el ajo acumula un conjunto de virus diferentes que forman un complejo sin posibilidades de liberarse de ellos en forma natural y que la existencia de cultivares de ajo totalmente infectados por virosis parece constituir la regla general de todas las áreas comerciales del mundo. Por todo lo anterior, se puede sugerir, aunque no confirmar, que el OYDV está infectando las muestras vegetales analizadas en el presente trabajo.

4.3. Tercera fase: Cálculo de la energía utilizada y de la capacidad calorífica de los dientes de ajo

4.3.1. Cálculo de la energía utilizada durante la aplicación de los tratamientos con corriente eléctrica

En el cuadro 4.6 se presentan los datos del gasto de energía en watt (P) que se tuvo en cada tratamiento durante la aplicación de la corriente eléctrica a dientes de ajo; conforme avanza el tiempo de aplicación el consumo de corriente por el material vegetal aumenta y disminuye el valor del voltaje inicial, provocando un calentamiento de los cuerpos biológicos lo que disminuye su resistencia, todo esto como consecuencia de la conducción de la corriente eléctrica debido a los electrolitos que se encuentran en las soluciones de dichos cuerpos (Remizov, 1987; Soto, 1988; Tattar y Blancard, 1976).

Al incrementarse el nivel del voltaje inicial y el tiempo de aplicación el gasto de energía también aumenta. los valores de gasto de energía fueron desde 1.1339 watt después de 30 segundos de aplicación con un voltaje inicial de 500 volts, hasta 78.75 watt con 90 segundos de aplicación y un voltaje inicial de 800 volts; sin embargo, estos valores son bajos si se comparan con el gasto que se tiene cuando se utiliza termoterapia en cámaras bioclimáticas durante varias semanas de tratamiento: Hernández *et al.* (1996) reporta un ahorro de 145.34 kw/h al usar electroterapia como pretratamiento al cultivo de ápices para el saneamiento de caña de azúcar. Además de la energía, el ahorro en tiempo es considerable, la

termoterapia se aplica durante varias semanas mientras que la electroterapia utiliza solamente unos minutos.

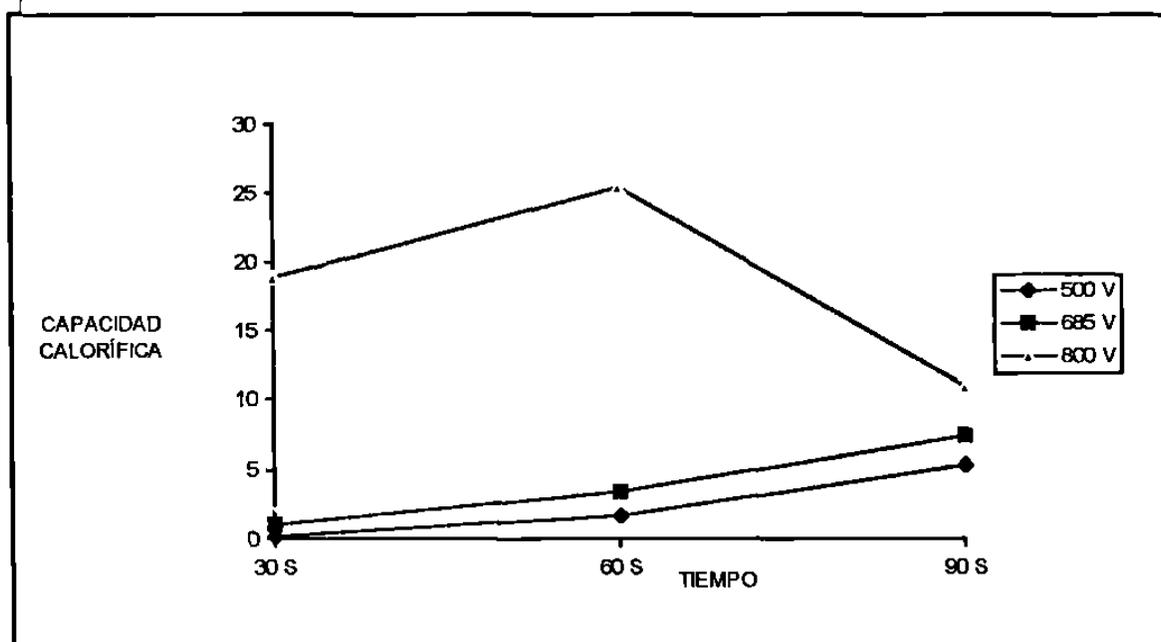
Lozoya y Dawson (1981) aplicaron alternancia de temperatura de 25 °C hasta 40 °C como termoterapia durante 2 semanas para observar su efecto sobre la infectividad de tobacco mosaic virus (TMV) infectando tabaco y del cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) infectando garbanzo. Conci *et al.* (1991) trataron dientes de ajo para su saneamiento con agua caliente y con aire caliente en cámara de crecimiento y en invernadero; los tratamientos con agua caliente fueron de 50 °C y 55 °C durante 5, 15 y 20 minutos, su eficiencia fue tan sólo del 13% de saneamiento; con aire caliente se aplicó una temperatura de 36 °C durante 30, 40 y 60 días, el porcentaje de regeneración disminuyó al incrementarse el tiempo de aplicación, y aumentó la eficiencia del saneamiento alcanzando hasta un 100% con 60 días de aplicación. Hernández *et al.* (1996) solamente aplicaron 10, 20 y 30 volts durante cinco minutos en cada nivel para saneamiento de caña de azúcar de escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans*), RSD (*Clavibacter xyli. sub sp xyli*) y el virus mosaico de la caña de azúcar; observaron una disminución de las posibilidades de establecimiento *in vitro* conforme se aumentó el voltaje pero se incremento la eficiencia del saneamiento llegando hasta un 100%.

4.3.2. Cálculo de la capacidad calorífica específica de los dientes de ajo

Los valores de capacidad calorífica se presentan en el cuadro 4.6, estos valores varían también con el nivel de voltaje aplicado y el tiempo de duración del tratamiento; Aguilar y Cázares (1989) reportan la capacidad calorífica específica de diversos productos agrícolas y los comparan con los obtenidos por otros autores siendo muy similares ambos resultados. Con la fórmula utilizada $c = Q/(m(t_2 - t_1))$ se puede apreciar que el resultado depende mucho de la masa vegetal y del diferencial de temperaturas. además, a pesar de que no interviene en la fórmula, el tiempo de aplicación de la corriente eléctrica altera el diferencial de temperaturas, por lo tanto es importante considerar que un cálculo más exacto puede hacerse manteniendo la masa del material vegetal similar en todas las muestras y el tiempo de aplicación constante en cada tratamiento.

Es difícil determinar cuál de los valores obtenidos de capacidad calorífica específica es el más acertado, ya que no se cuenta con datos bibliográficos que respalden tales valores; sin embargo, es importante obtener la capacidad calorífica del material vegetal al cual en lo futuro se le aplicará corriente eléctrica, conociéndola se podrían establecer los valores de corriente y voltaje necesarios para llevar la temperatura del material vegetal, desde una temperatura inicial a una temperatura final determinada; esto sería una ventaja, ya que solamente se tendrían que establecer los tiempos de aplicación de la corriente eléctrica a los cuales se alcanzan dichas temperaturas; los cambios en los valores de capacidad calorífica debido a los diferentes tratamientos se pueden observar en la figura 4.7.

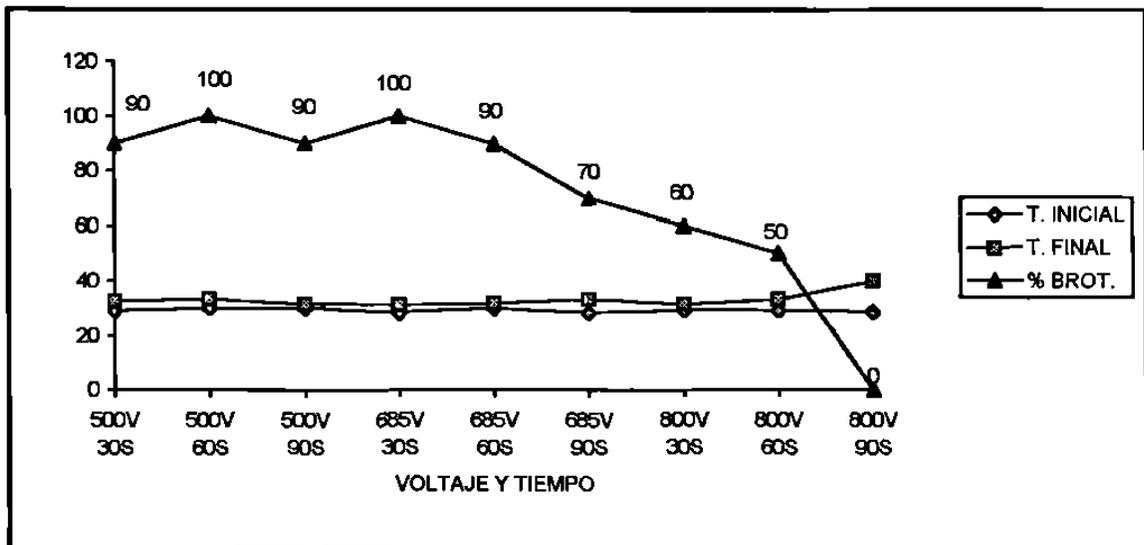
Figura 4.7. Variación en los valores de la capacidad calorífica específica de dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, por efecto de los diferentes tratamientos de voltaje y tiempo.



La importancia del incremento de la temperatura por efecto de la corriente eléctrica radica en que es el único factor explicable hasta el momento relacionado con la atenuación de virus vegetales; ninguno de los autores citados que realizaron investigación con electroterapia explica las posibles causas de sus efectos, solamente Quacquarelli *et al.* (1982) hacen referencia al incremento de temperatura como posible causa de los efectos de la corriente eléctrica sobre virus del almendro. Por otro lado es muy difícil

asegurar que sea el único factor involucrado con el uso de la corriente eléctrica, ya que los tiempos de aplicación reportados en la literatura son demasiado cortos en comparación con la termoterapia normal, aunque sus efectos sobre la capacidad de regeneración y la eficiencia del saneamiento son muy similares; en la figura 4.8 se observan las tendencias de la temperatura final de los dientes de ajo tratados así como los porcentajes de brotación por efecto de los diferentes tratamientos con corriente eléctrica.

Figura 4.8. Tendencia de la temperatura final alcanzada por los dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, y los porcentajes de brotación obtenidos con los diferentes tratamientos de voltaje y tiempo.



Cuadro 4.6. Energía utilizada y capacidad calorífica específica de dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, con diferentes tratamientos de tiempo y voltaje

TRAT	MASA GR.	T. INIC. °C	T. FINAL °C	TIEMPO (SEG)	VOLT (V)	CORR (A)	RESIST (OHMS)	CORR2 (A)	P (WATTS)	Q (JULIUS)	CAL CALORIAS	CAP CAL CAL/GR C
1	10	28	31.7	0	494	0.0019	260000	0.0000036	0.9386	0	0	
1		29	33	10	494	0.0022	224545.45	0.0000048	1.0868	10.868	2.597452	
1		29.8	33.2	20	493	0.0022	224090.90	0.0000048	1.0846	21.692	5.184388	
1		86.8	97.9	30	493	0.0023	214347.82	0.0000052	1.1339	34.017	8.130063	0.220
		28.93	32.63									
2	9.1	30.1	31.8	0	499	0.002	249500	0.000004	0.998	0	0	
2		30	33.7	10	499	0.0032	155937.5	0.0000102	1.5968	15.968	3.816352	
2		29.9	34	20	498	0.004	124500	0.000016	1.992	39.84	9.52176	
2		90	99.5	30	498	0.0047	105957.44	0.0000220	2.3406	70.218	16.782102	
2		30	33.16	40	498	0.0052	95769.230	0.0000270	2.5896	103.584	24.756576	
2				50	497	0.006	82833.333	0.000036	2.982	149.1	35.6349	
2				60	497	0.007	71000	0.000049	3.479	208.74	49.88886	1.73
3	6.7	29.5	29.8	0	499	0.0012	415833.33	0.0000014	0.5988	0	0	
3		29.7	32	10	499	0.0021	237619.04	0.0000044	1.0479	10.479	2.504481	
3		30.3	32	20	498	0.0024	207500	0.0000057	1.1952	23.904	5.713056	
3		89.5	93.8	30	499	0.0028	178214.28	0.0000078	1.3972	41.916	10.017924	
3		29.83	31.26	40	499	0.003	166333.33	0.000009	1.497	59.88	14.31132	
3				50	498	0.0033	150909.09	0.0000108	1.6434	82.17	19.63863	
3				60	498	0.0038	131052.63	0.0000144	1.8924	113.544	27.137016	
3				70	495	0.004	123750	0.000016	1.98	138.6	33.1254	
3				80	494	0.0044	112272.72	0.0000193	2.1736	173.888	41.559232	
3				90	494	0.0048	102916.66	0.0000230	2.3712	213.408	51.004512	5.32

Cuadro 4.6. Energía utilizada y capacidad calorífica específica de dientes de ajo (*Allium sativum* L), clon Cadereyta, con diferentes tratamientos de tiempo y voltaje

TRAT	MASA GR.	T. INIC. °C	T. FINAL °C	TIEMPO (SEG)	VOLT. (V)	CORR (A)	RESIST (OHMS)	CORR2 (A)	P (WATTS)	Q (JULIUS)	CAL CALORIAS	CAP CAL CAL/GR C
4	10	27	30.5	0	674	0.0015	449333.33	0.0000022	1.011	0	0	
4		28.5	31.7	10	669	0.0044	152045.45	0.0000193	2.9436	29.436	7.035204	
4		29.2	31.7	20	666	0.006	111000	0.0000036	3.996	79.92	19.10088	
4		84.7	93.9	30	662	0.007	94571.428	0.0000049	4.634	139.02	33.22578	1.08
		28.23	31.3									
5	12.5	28.9	31	0	675	0.0012	562500	0.0000014	0.81	0	0	
5		29.7	31.2	10	676	0.0032	211250	0.0000102	2.1632	21.632	5.170048	
5		30.3	32.7	20	672	0.0042	160000	0.0000176	2.8224	56.448	13.491072	
5		88.9	94.9	30	670	0.0051	131372.54	0.0000260	3.417	102.51	24.49989	
5		29.63	31.63	40	670	0.0064	104687.5	0.0000409	4.288	171.52	40.99328	
5		-	-	50	668	0.0077	86753.246	0.0000592	5.1436	257.18	61.46602	
5				60	666	0.009	74000	0.000081	5.994	359.64	85.95396	3.44
6	10	26.7	31.6	0	675	0.0018	375000	0.0000032	1.215	0	0	
6		28.6	34	10	671	0.0043	156046.51	0.0000184	2.8853	28.853	6.895867	
6		28.6	33.5	20	667	0.003	222333.33	0.000009	2.001	40.02	9.56478	
6		83.9	99.1	30	665	0.0081	82098.765	0.0000658	5.3865	161.595	38.621205	
6		27.96	33.03	40	659	0.0102	64607.843	0.0001040	6.7218	268.872	64.260408	
6				50	657	0.013	50538.461	0.000169	8.541	427.05	102.06495	
6				60	653	0.016	40812.5	0.000256	10.448	626.88	149.82432	
6				70	647	0.0199	32512.562	0.0003960	12.8753	901.271	215.40376	
6				80	640	0.0238	26890.756	0.0005664	15.232	1218.56	291.23584	
6				90	632	0.028	22571.428	0.000784	17.696	1592.64	380.64096	7.5

Cuadro 4.6. Energía utilizada y capacidad calorífica específica de dientes de ajo (*Allium sativum* L.), con Cadereyta, con diferentes tratamientos de tiempo y voltaje

TRAT.	MASA GR.	T. INIC. °C	T. FINAL °C	TIEMPO (SEG)	VOLT. (V)	CORR (A)	RESIST (OHMS)	CORR2 (A)	P (WATTS)	Q (JULIUS)	CAL CALORIAS	CAP. CAL. CAL/GR C
7	8.7	29.2	35.5	0	800	0	0	0	0	0	0	0
7		28.8	28.8	10	760	0.0239	31799.163	0.0005712	18.164	181.64	43.41196	
7		29.5	29.5	20	726	0.042	17285.714	0.001764	30.492	609.84	145.75176	
7		87.5	93.8	30	675	0.071	9507.0422	0.005041	47.925	1437.75	343.62225	18.81
		29.16	31.26									
8	10.5	29.2	35.5	0	790	0.0046	171739.13	0.0000211	3.634	0	0	0
8		28.8	31.9	10	777	0.012	64750	0.000144	9.324	93.24	22.28436	
8		29.5	32.1	20	763	0.0223	34215.246	0.0004972	17.0149	340.298	81.331222	
8		87.5	99.5	30	733	0.0414	17705.314	0.0017139	30.3462	910.386	217.58225	
8		29.16	33.16	40	688	0.0623	11043.338	0.0038812	42.8624	1714.496	409.76454	
8				50	628	0.098	6408.1632	0.009604	61.544	3077.2	735.4508	
8				60	570	0.131	4351.1450	0.017161	74.67	4480.2	1070.7678	25.5
9	13.9	28	41.3	0	791	0.005	158200	0.000025	3.955	0	0	0
9		29.2	41	10	781	0.0097	80515.463	0.0000940	7.5757	75.757	18.105923	
9		29.4	38	20	774	0.0154	50259.740	0.0002371	11.9196	238.392	56.975688	
9		86.6	120.3	30	756	0.0249	30361.445	0.0006200	18.8244	564.732	134.97094	
9		28.86	40.1	40	734	0.037	19837.837	0.001369	27.158	1086.32	259.63048	
9				50	699	0.057	12263.157	0.003249	39.843	1992.15	476.12385	
9				60	655	0.081	8086.4197	0.006561	53.055	3183.3	760.8087	
9				70	608	0.106	5735.8490	0.011236	64.448	4511.36	1078.2150	
9				80	564	0.132	4272.7272	0.017424	74.448	5955.84	1423.4457	
9				90	525	0.15	3500	0.0225	78.75	7087.5	1693.9125	11

5. CONCLUSIONES

Después de realizar el presente trabajo de investigación y de analizar y discutir los resultados obtenidos en cada una de sus diferentes etapas, se llegó a las siguientes conclusiones:

1.- Se construyeron dos equipos para la aplicación de corriente eléctrica a material vegetal de propagación para utilizarse sobre dientes de ajo; dichos equipos difieren en su funcionamiento y en su manera de operación, pero son similares en los efectos que se tienen por aplicación de la corriente eléctrica con cada uno de estos en los dientes de ajo utilizados como semilla.

2.- Considerando la sintomatología observada y la reacción en color de los conjugados con el sustrato en las celdas de la placa para ELISA, las plantas de ajo de los diferentes clones colectados en un campo de producción de semilla, están infectados al menos por el virus del estriado amarillo del puerro (leek yellow streak virus, LYSV).

3.- El tratamiento con corriente eléctrica reduce los porcentajes de brotación de los dientes de ajo y provoca un incremento de temperatura en los mismos dependiendo del voltaje aplicado, tales efectos varían también en los diferentes clones utilizados; sin embargo, hay sobrevivencia de dientes después de ser aplicada la electroterapia; estos efectos son muy similares a los causados mediante una termoterapia normal. Por lo tanto, el tratamiento con corriente eléctrica puede ser probado como pretratamiento al cultivo *in vitro* de ápices para saneamiento de virus que atacan al cultivo del ajo.

6. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de motivar a realizar más investigación sobre la técnica de electroterapia en el complejo viral del ajo, se hacen las siguientes recomendaciones:

1.- Buscar la combinación más adecuada entre las cualidades de ambos equipos construidos para el tratamiento con corriente eléctrica a material vegetal.

2.- Ajustar el protocolo utilizado para los análisis de ELISA para evitar errores y reacciones equivocadas durante el mismo, de manera tal que pueda hacerse un diagnóstico completo por sintomatología observada, reacción por coloración de las celdas de la placa y en base a los valores de densidad óptica.

3.- Una vez ajustado el protocolo realizar nuevamente los análisis de ELISA para corroborar los resultados aquí presentados, así como también realizar un segundo análisis después de aplicados los tratamientos con corriente eléctrica.

4.- De los dientes sobrevivientes al tratamiento con corriente eléctrica extraer los ápices y establecerlos *in vitro* para determinar el efecto conjunto de la electroterapia y el cultivo de ápices *in vitro* sobre la eliminación de virus que atacan el cultivo del ajo.

7. LITERATURA CITADA

- Aguilar, A. M. y Cázares, L. G. 1989. Determinación del calor específico de algunos vegetales y frutas. Reporte especial. 15 p.
- Agrios, G. N. 1995. Fitopatología. Trad. Manuel Guzmán Ortiz. 2ª ed. Ed. Limusa. México. 756 pp.
- Anónimo. 1979. Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica. 4ª ed. Ed. DANA S. A. Barcelona. p 1066.
- Bruna, V. A., Escaff, G. M. y Muñoz. S. C. 1992. Identificación del virus del enanismo amarillo de la cebolla ("Onion yellow dwarf virus") en ajo (*Allium sativum* L). Agricultura Técnica (Chile). 52 (1): 85-89.
- Cárdenas, S. E. 1986. Diagnóstico de Virus Mediante Inclusiones Virales. Colegio de postgraduados. 72 p.
- Cárdenas, S. E. 1992. Diagnóstico e identificación de virus en hortalizas. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. pp 327-332.
- Cárdenas, A. M. L. 1995. Cultivo *in vitro* de brotes de ajo *Allium sativum* L. de tres variedades obtenidas en Marín, N. L. México. Tesis de Maestría en Ciencias. U.A. N. L. 49 p.
- Conci, V. C. 1991. Virosis de ajo, diagnóstico y obtención de plantas libres. 1º y 2º curso taller sobre producción, comercialización e industrialización del ajo. INTA. Argentina. pp 56-59.
- Conci, V. C. and Nome, F. 1992. Virus-free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem-tip culture. J. Plant phytopathology. 132: (3). 186-192.
- Conci, V., S., Nome, F. and Milne, R.G. 1992. Filamentous viruses in garlic in Argentina. Plant. Dis. 76:594-596.
- Conci, V. C. 1997. Virus y fitoplasmas de ajo. En: 50 Temas Sobre Producción de Ajo. Editor: José Luis Burba. Estación Experimental Agropecuaria La Consulta. INTA. La Consulta, Argentina. pp. 267-291.
- Cournet, P. 1992. Elementos de Virología Vegetal. Trad. Antonio Peña Iglesias. Ed Mundi Prensa. España. 218 p.
- Dawson, W. O., White, J. L. and Grantham, G. L. 1978. Effect of heat treatment upon cowpea chlorotic mottle virus ribonucleic acid replication. Phytopathology 68: 1042-1048.
- Deng, T. C., Tsai S. W. and Tsai T. W. 1991. Occurrence of garlic latent virus in Taiwan and this biological characterization. Journal of agricultural research of China. 40 (3): 333-345. (Resumen CAB abst.).
- Ding, X. S., Walkey D. G. A., Webb M. J. W and Bolland. C. T. 1988. Techniques for producing virus free garlic. Acta agriculturae Shangai. 4(1): 23-38. (Resumen CAB Abst.).
- Dunez, J. 1987. Perspectives in the control of plant viruses. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control. (Ilan Chet ed.) John Willey and sons. U.S.A. 372 p.
- Estrella, S. M- G. 1988. Consistencia del número de dientes de ajo (*Allium sativum* L) en la variedad criolla de Cadereyta. Tesis de licenciatura. FAUANL. Marín, N. L. 73 p.
- Francki, R. I. B., Milne, R. G. and Hatta T. 1985. Atlas of Plant Viruses. Vol I. CRC Press, Inc. Boca Raton Fl. 284 pp.
- Fucikovsky, L. 1992. Enfermedades bacterianas en hortalizas. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. pp 271-272.
- Fukami, M. Natsuaki, K. T. Motuyoshi, F. and Tamaru, K. 1989. Simple and rapid detection of Garlic Latent Virus from welsh onion by gelatin particle agglutination test. Ann Phytopath. soc. Japan. 55: 671-675.
- Fukami, M. and Ishii, K. 1991. Ocurrence of Garlic Latent Virus (GLV) and Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) on seedless welsh onion "Bozushirazu" in Chiba Prefecture and influence of their yield. Bull. Chiba Agric. Exp. Station. 32: 9-17.
- Fukami, M. 1991. Detection of Onion Yellow Dwarf Virus and Garlic Latent Virus from welsh onion with dot-immunobinding assay. proc. of the Kanto tosan plant protection society. 38: 79-81.
- García, A. M. 1988. Fitopatología Vegetal Práctica. Segunda edición. Editorial Limusa. México. 256 p.
- García, A. C. R. 1990. El ajo: Cultivo y Aprovechamiento. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 168 pp.

- Gibbs, A. and Harrison, B. 1976. Plant Virology. The Principles. Edward Arnold (Publishers) LTD. Great Britain. 299 p.
- Ginoza, W. 1977. Inactivation by ionizing radiation and by heat. In: Methods in Virology. Vol. 6. K. Maramorosch and H. Koprowski, eds. Academic Press. New York. pp 180-209.
- Gómez, C. M. A., Schwentesius, R. R. y Merino, S. A. 1991. El Consumo de Hortalizas en México. CIESTAAM-UACH. Chapingo, México. 37 p.
- Graichen, K., Kromat, H. and Meyer, U. 1988. Effect of virus infection on the yield performance of the garlic cultivar thuringer. Gartenbau. 35 (9): 266-267. (Resumen CAB Abst.).
- Guerrero, N. J. 1978. Búsqueda de recursos para mejorar la eficiencia de técnicas para erradicar virus en materiales vegetativos. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados, Chapingo, México. 75 p.
- Hernández, R. y Ruiz, M. 1992. Técnica de diagnóstico para el complejo viral del ajo (*Allium sativum* L.) mediante plantas indicadoras y microscopía óptica. Reporte especial. 4 p.
- Hernández, P. R., Prado, O., Gil, D. V., Perez, P. J., Ruiz, M. y Font, C. 1994. Producción de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus mediante cultivo de meristemos. Centro Agrícola. No 1. 76-84.
- Hernández, P. R., Noa, C. J. C., Pichardo, M. T., Aguilar, G. E., Del Sol, E. L. y Martínez, S. 1995. Optimización del diagnóstico mediante ultramicroELISA (UM-ELISA) por estandarización de tres kits, Virus Manchado Anular de la Fruta Bomba (PRSV), Virus del Estriado Amarillo del Ajo Puerro (LYSV) y Virus del Enanismo de la Cebolla (OYDV). Fitopatología Mexicana (en prensa). 13 pp.
- Hernández, P. R., Igarza, C. Y., Lilia, P. E., Fontanella, J., Pichardo, M. T., Sarria, H. Z., Noa, C. J. C. García, L., Rodríguez, M. y Alfonso, E. 1996. Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Memorias del XXIII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara. Jalisco, México.
- Holiday, D. and Resnick, R. 1988. Fundamentals of Physics. 3rd. ed. John Wiley and Sons editors. Canada. 977 p.
- Hornedo, M. A. C. 1987. El ajo, algo más que cabeza y dientes. Síntesis hortícola. 1 (7): 19-20.
- INEGI. 1997. Cultivos Anuales de México. VII Censo agropecuario. p 8-14
- Iwai, H., Mitsushima, T., Etoh, T. and Arai, K. 1990. Detection of two viruses from garlic clone by ELISA. University Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagoshima. 40: 1-7. (Resumen CAB Abst.).
- Koch, M. and Salomon, R. 1994. Serological detection of onion yellow dwarf virus in garlic. Plant Dis. 78:785-788.
- Laborde, J. A. 1992. Control integrado de pudrición Blanca del ajo en el bajo. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. pp 351-353.
- Lozoya, S. H. and Dawson, W. O. 1982. Effect of alternating temperature regimenes on reduction or elimination of viruses in plant tissue. Phytopathology. 72: 1059-1064.
- Lozoya, S. H., Abello, F. and García, G. 1995. Electrotherapy and shoot tip eliminate potato virus X (PXV) in potato. Reporte de investigación. Chapingo, México. 15 pp.
- Lot, H., Delcolle, B., Boccardo, G., Marzachi, C. and Milne, R. G. 1994. Partial characterization of reovirus-like particles associated with garlic dwarf disease. Plant pathology. 43: 537-546.
- Matsubara, S., Chen, D., Masuda, M. and Murakami, K. 1990. The production and proliferation of bulbs from receptacles of virus free garlic plants. Scientific reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University. 75: 9-13. (Resumen CAB abst.).
- Mendoza, Z. C. 1992. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. 273-312 p.
- Milne, R. G. and Luisonu, E. 1976. Rapid immune electron microscopy of virus preparation. In: Methods in Virology. K. Maramorosh and M Kaproski editors. Academic New York. pp. 265-281.
- Nagakubo, T., Kubo, M. and Oeda, K. 1994. Nucleotide sequences of the 3' regions of two majors viruses from mosaic-diseased gralic: molecular evidence of mixed infection by a potyvirus and a carlavirus. Phytopathology. 84:640-645.
- Nome, S. F. 1987. Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicados al cultivo de tejidos. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. INTA. Córdoba, Argentina. pp 663-695.

- Olivares, S. E. 1996. Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación Agrícola y Pecuaria. CIA-FAUANL. 291 p.
- Otero, C. G. 1992. Ácaros plaga de hortalizas. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. pp 136-151.
- Pérez, M. L., Ramírez, G. I. y Salinas G. J. G. 1994. Selección de materiales de ajo (*Allium sativum* L.) con buenas características agronómicas de entre los mutantes del cultivar pocitas tolerantes a la "pudrición blanca" (*Sclerotium cepivorum* Berck.). En: Memorias del 11º Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética. Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Monterrey, N. L., México. p 472.
- Pérez, M. L., Sánchez, P. J. R., Salinas, G. J. G. y Redondo, J. E. 1996. Evaluación de líneas de ajo *Allium sativum* L. (SIR-SAL) generadas por irradiación tolerantes a la pudrición blanca *S. cepivorum*. Memorias del XVI Congreso de Fitogenética. SOMEFI. p 59.
- Pérez, R. L., Ramírez, R. and Salinas, J. G. 1996b. Obtention of virus-free potyvirus garlic plants. *Phytopathology*. 86 (11): S117. (Suplement).
- Quacquarelli, A.V., Gallitelli, D., Savino, V. and Piazzola, P. 1980. The use of electric current (R.A.C.E.) for obtaining mosaic free almonds. *Acta Phytopatologica Academica Scientiarum hungaricae*. Vol 15 (2): 251-255.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus plants. In: Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinhart and Y. P. S. Bajaj Editors. Springer Verlag, New York. pp 598 - 615.
- Remizov, A. 1987. Física Médica y Biológica. Ed. Mir Moscú. U.R.S.S. 692 p.
- Salomon, R. Koch, M. Levy, S. and Gal-on, A. 1996. Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic. BCPC Symposium proceedings. Diagnostic in crop production. 65:193-198.
- Salvat Mexicana de Ediciones. S. A. de C. V. 1983. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. 11ª ed. Ed Salvat. México. 1073 p.
- Sherf, A. F. and Macnab, A. A. s/a. Vegetable Diseases and Their Control. Second ed. John Wiley & sons Eds. New York. pp 473-465.
- Smith, K. M. 1972. A Textbook of Plant Virus Disease. Third edition. Ed: Academic Press. New York and London. 684 p.
- Sobrinho, I. E. y Sobrinho V. E. 1992. Tratado de Horticultura Herbácea. Tomo II. Ed. Aedos S.A. Barcelona, España. 335 p.
- Soto, R. R. 1988. Introducción a la Biofísica. Tomo 3. Ed. Oriente. Santiago de Cuba. 441 p.
- Sutarya, R. and Van Dijk, P. 1994. Viruses diseases of shallot and garlic in Java and perspects for their control. *Acta horticulturae*. 369: 134-140.
- Tattar, T. A. and Blanchard, R. O. 1976. Electrophysiological research in plant pathology. *Ann. Rev. of phytopathol*. 14: 309-325.
- Tsuneyoshi, T. and Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology* 86:253-259.
- Urias M. C. y Alejandre, A. T. 1992. Los virus y su impacto en la producción agrícola. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. 333-350 p.
- Valverde, M. E. y Paredes-L. O. 1996. El uso de los marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad. El caso de los hongos. *Ciencia y desarrollo*. 3:29-37.
- Van Dijk, P., Verbeek, M. and Bos, L. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruse in the family *Potyviridae*. *Neth. J. Pl. Path.* 97: 381-399.
- Van Dijk, P. 1993a. Survey and characterization of potyviruses and their strains of allium species. *Neth. J. Pl. Path.* 99: 1-48. Supplement 2.
- Van Dijk, P. 1993b. Carlaviruses isolates from cultivated *allium* species represent three viruses. *Neth. J. Pl. Path.* 99: 233-257.
- Velázquez, V. R. 1990. El cultivo del ajo en Zacatecas. En: Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Fitogenética, Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Cd. Juárez, Chih., México. 472 p.

- Vidales, F. J. A. y Delgadillo S. F. 1987. Detección de virus de semillas de melón y pepino en el Valle de Apatzingán, Michoacán. En: Enfermedades Virales del Melón (*Cucumis melo*) y su Control en México. INIFAP-SARH. 18-21 pp.
- Walkey, D. G. A. and Antill, D. N. 1989. Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *J. of Hort. Sc.* 64 (1) 53-60.
- Weiss, G. 1922. Manual de Física Biológica. Trad. Jaime Mur y Sancho. 5ª ed. Ed: Editora Nacional. México, D. F. 640 pp.
- Yamashita, K. and Oikawa, K. 1992. Detection of garlic mosaic virus by DIBA and indirect ELISA. Annual report of the society of plant protection of North Japan. 43: 66-68. (Resumen CAB Abst.).
- Zaag, D. E. 1987. Yield reduction in relation to virus infection. In: Viruses of Potato and Seed Potato Production. Ed. Van Der Want. pp 146-150.
- Zavaleta, M. E. 1992. Especies de nemátodos que dañan hortalizas. En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Ed. Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. p 313-326.

**“Para poder dar órdenes
a la naturaleza, hay
que saber obedecerla”**

**Francis Bacon
Filósofo Inglés**

