

MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

METODOS CURATIVOS DE LUCHA  
CONTRA LAS VIROSIS DE LOS  
ARBOLES FRUTALES

# LA TERMOTERAPIA

**COMUNICACIONES I. N. I. A.**

SERIE: PROTECCION VEGETAL

N.º 2

1974

MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

205



**METODOS CURATIVOS DE LUCHA  
CONTRA LAS VIROSIS DE LOS  
ARBOLES FRUTALES**

**LA TERMOTERAPIA**

**Gerardo Llácer**

Doctor Ingeniero Agrónomo  
Departamento de Fruticultura  
Centro Regional de Investigación y Desarrollo  
Agrario del Ebro (CRIDA 03), INIA.  
Zaragoza

MADRID - 1974

## INDICE

	Pág
Introducción	5
El cultivo de meristemas	5
La termoterapia	6
La quimioterapia	21
Referencias bibliográficas	23

## INTRODUCCION

La importancia de las enfermedades producidas por virus en los árboles frutales, radica sobre todo en el hecho de que se trata de enfermedades incurables. No existen métodos de lucha curativos propiamente dichos, del tipo de los que se utilizan para combatir en el campo otras plagas y enfermedades. Sí existen, sin embargo, algunos métodos de regeneración de clones, que son curativos en el sentido de que permiten obtener fragmentos de planta sanos a partir de plantas enfermas. Estos métodos se hacen imprescindibles cuando nos encontramos con determinadas variedades, generalmente de origen antiguo, en las cuales resulta imposible descubrir ni un solo clon libre de virus, lo que convierte en inútiles los métodos habituales de lucha preventiva basados en la selección sanitaria (Morvan, 1971).

Los métodos de regeneración de clones son fundamentalmente tres:

- El cultivo de meristemos.
- La termoterapia.
- La quimioterapia.

De estos tres métodos, el único desarrollado en gran escala, en el caso de los árboles frutales, es el de la termoterapia, del que existe una abundante bibliografía. Tratando de sintetizar tantos datos dispersos, se celebró en 1970 un coloquio sobre «La Termoterapia de las Especies Leñosas» en la Estación de Cultivos Frutales y Hortícolas de Grand-Manil, en Gembloux (Bélgica). La documentación de este coloquio, junto con muchos trabajos anteriores y posteriores al mismo, nos servirá de base para la presente revisión que se dedicará, preferentemente, por lo que hemos dicho, a la termoterapia.

### 1. El cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos, como método de obtener fragmentos de planta sanos a partir de plantas enfermas, se basa en que los virus, aunque en teoría se difunden por toda la planta infectada, no suelen alcanzar a las células indiferenciadas de los extremos de los tallos, es decir, los meristemos apicales. En consecuencia, si se logra separar dichos meristemos y cultivarlos «in vitro», podremos obtener plantas sanas. Por este procedimiento se han obtenido resultados muy satisfactorios en el caso de la patata, clavel, dalia, crisantemo, etc., habiendo estudiado varios autores (Baker y Phillips, 1962; Hollings y Stone, 1968; Quak, 1970) los di-

ferentes factores que influyen en el éxito de esta técnica: la variedad empleada, la composición del medio de cultivo, el tipo de soporte y de recipiente utilizado, las condiciones de esterilización, el tamaño de los ápices, los factores ambientales, etc.

A pesar de estos conocimientos adquiridos, el cultivo de meristemos presenta todavía muchas dificultades en el caso de los árboles frutales, cuyos meristemos resultan hoy por hoy casi imposibles de cultivar por no emitir raíces. Tratando de salvar este obstáculo, se ha intentado recientemente (Peña y Ayuso, 1973) aplicar a los frutales la técnica del microinjerto «in vitro», ya utilizada anteriormente en la regeneración de clones de agrios, para evitar la excesiva prolongación del período juvenil en las plantas resultantes de embriones nucelares (Murashige et al., 1972).

## 2. La termoterapia

### 2.1 Fundamento y objetivos

El fundamento de la termoterapia radica en la acción del calor sobre la multiplicación de los virus. Más adelante nos detendremos algo más en el modo en que tiene lugar dicha acción. Ahora nos bastará saber que a partir de ciertas temperaturas, se produce la inmovilización o la inactivación del virus dentro de la planta huésped.

Aunque existen referencias de la inactivación total de virus del fresal en plantas cultivadas en condiciones naturales de elevadas temperaturas (Frazier et al., 1965), se cree que durante los tratamientos por termoterapia la inactivación de los virus raramente es definitiva, de modo que la curación de una planta completa se considera poco menos que imposible. Sólo los ápices de los brotes crecidos durante el tratamiento presentan probabilidades bastante altas de estar libres de virus. Desde este punto de vista, la termoterapia no sería más que una modificación o mejora del cultivo de meristemos apicales que, al permitir trabajar con ápices de 0,5-1 cm., en lugar de reducirse al simple meristemo más uno o dos primordios de hojas, con una longitud total entre 0,1 y 0,5 mm., aumenta notablemente la facilidad de manejo y el porcentaje de éxitos. La utilización conjunta del cultivo de meristemos y del tratamiento térmico, con objeto de incrementar el tamaño de los ápices sin que pierdan por ello su carácter de libres de virus, ha sido aplicada por Houten et al. (1967) al clavel, crisantemo y fresal.

Sin embargo, también algunas yemas laterales pre-existentes al tratamiento pueden quedar libres de virus por efecto del calor, aunque las probabilidades sean menores que en el caso de los ápices formados durante el tratamiento. Estas diferentes posibilidades originan los diversos métodos de termoterapia por aire caliente que describiremos en 2.2.

El principal objetivo de la termoterapia es, claro está, la obtención de material vegetal libre de virus. Con esta intención ha sido aplicada en múltiples ocasiones a numerosas especies leñosas: el rosal (Holmes, 1960; Traylor et al., 1967), el manzano y el peral (Posnette et al., 1962;

Fry, 1970), la vid (Galzy, 1964), el melocotonero (Marenaud y Saunier, 1969), el frambueso (Putz, 1970), etc.

Otra aplicación menos utilitaria de la termoterapia, pero muy interesante para el investigador, es la posibilidad de aprovechar la diferente duración del tratamiento requerido para eliminar a cada uno de los componentes de un complejo viral, para separarlos y poner así de manifiesto su composición (Marenaud y Keramidas, 1969).

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Termoterapia por agua caliente

En su estudio general de la termoterapia como medio destructor de patógenos, Baker (1962) distingue dos grandes métodos según la intensidad del calor aplicado y la duración de la aplicación:

- Alta intensidad/corta duración de aplicación.
- Baja intensidad/larga duración de aplicación.

El primero de estos métodos es el que se aplica por medio del agua caliente, a temperaturas del orden de los 50-60° C, en la que se sumergen órganos en estado de latencia durante un tiempo que puede variar entre pocos minutos y algunas horas. Naturalmente, este método no es aplicable durante la fase de vegetación activa, ya que las citadas temperaturas dañarían irremediablemente a las plantas. Tiene su máxima aplicación en el cultivo de la caña de azúcar, en el que todo el material de plantación es tratado sistemáticamente (Kassanis, 1965). A los árboles frutales fue aplicado por primera vez por Kunkel (1936) sobre melocotonero y, aunque posteriormente ha sido ensayado sobre cerezo, manzano y ciruelo (Marenaud y Dunez, 1969), pronto se comprobó que este método era poco práctico frente a las ventajas de la termoterapia por aire caliente.

### 2.2.2. Termoterapia por aire caliente

En contraposición con el método anterior, la termoterapia por aire caliente corresponde a una baja intensidad/larga duración de aplicación. Los tratamientos se realizan en cámaras con control de temperatura, luz y humedad. Las temperaturas más adecuadas son de 37-38° y la duración de aplicación oscila entre una y varias semanas.

Según la parte de la planta que se utiliza para la multiplicación después del tratamiento, se distinguen varios métodos:

— El que podemos denominar «clásico», empleado inicialmente por los investigadores europeos (Posnette et al., 1962; Campbell, 1962, etc), y que consiste en utilizar solamente los ápices de los brotes crecidos durante el tratamiento, en la suposición de que el efecto del calor sobre los virus se reduce a su inmovilización o, al menos, a la neta reducción de su velocidad de multiplicación en los tejidos que se hallan en pleno

crecimiento. Dichos ápices deben, pues, ser separados del resto de la planta, que permanecerá infectada, y ser injertados sobre un patrón sano.

— El método llamado Nyland, debido a este investigador norteamericano, el cual puso de manifiesto, primero en frutales de hueso (Nyland, 1960) y luego en manzano (Welsh y Nyland, 1965), que, contrariamente a lo que se creía, las yemas laterales de brotes pre-existentes al tratamiento pueden quedar libres de virus tras un período de dos semanas a 38° C. Ello supone una verdadera inactivación irreversible del virus y no una simple inmovilización.

— Una variante debida a Hunter et al. (1958), consiste en injertar una yema del árbol enfermo sobre un patrón sano y, unos días después, suficientes para que prenda la yema pero no para que se difunda el virus en el patrón, introducir la planta en la cámara. Completado el tratamiento, se favorece el crecimiento de la yema injertada.

Winter (1965) realizó, en el caso concreto de un virus del manzano, una experiencia que, basándose en la última técnica descrita, comparaba los porcentajes de curación entre plantas obtenidas a partir de ápices y de yemas laterales. Dichos porcentajes fueron semejantes, pero, aun admitiendo que con otros virus el porcentaje de curación fuese superior a partir de ápices, el rendimiento final puede ser favorable a la utilización de yemas laterales, ya que de cada brote se obtienen varias yemas laterales por un solo ápice. Por otra parte, el injerto de yemas laterales ofrece muchas menos dificultades que el de yemas apicales.

### 2.3. Factores que influyen en el crecimiento durante el tratamiento térmico

En este punto, como en todos los siguientes, nos referiremos ya siempre a la termoterapia por aire caliente, que es la que se utiliza casi exclusivamente para los árboles frutales.

Son muchos los factores que influyen en el crecimiento durante el tratamiento por el calor. Las temperaturas utilizadas, de 37-38° C. son límites para la vida de los árboles, por lo que su crecimiento sólo es posible cuando todas las demás condiciones se ajustan rigurosamente a esa situación límite. Repasaremos algunos de los factores más importantes

#### 2.3.1 Preparación del material vegetal

Los árboles que van a ser sometidos al tratamiento necesitan previamente un período de habituación a la vida en maceta. Este período puede variar de uno a tres años según la preparación que se de al material. Por ejemplo, se puede injertar un portainjerto plantado ya en maceta el invierno anterior y tratarlo al año siguiente (1), o bien no tratar al año siguiente al injerto, sino esperar un año más (2), o todavía, injertar un portainjerto plantado en vivero, trasplantarlo a maceta al año de injerto y tratar un año después (3)

El procedimiento (1) es arriesgado. Es necesario que el crecimiento se inicie en invernadero, esperar a la lignificación del brote y rebajarlo entonces sobre tres o cuatro yemas, iniciando el tratamiento en el momento en que éstas empiecen a brotar. El procedimiento (3) es el ideal para el mejor desarrollo de la planta, pero es muy largo. El procedimiento (2) no es tan largo y da resultados suficientemente satisfactorios. Es conveniente hacer una poda relativamente corta de estos arbolitos, suprimiendo los ramos necesarios para que los brotes no se molesten unos a otros (Maroquin, 1970b).

#### 2.3.2. Aclimatación previa

Si los árboles a tratar se someten bruscamente a la temperatura de 37-38° C, se produce, cuando menos, una detención del crecimiento que puede durar dos o tres semanas. En el caso de que dichos árboles estuviesen todavía en reposo, éste persiste indefinidamente y si, por azar, se desarrolla algún brote, lo hace débilmente y termina por secarse (Maroquin, 1970b). De ahí que este autor y otros (Campbell, 1970a) recomienden subir la temperatura progresivamente, cuatro o cinco grados cada cuatro días, hasta llegar a la requerida por el tratamiento. Con esta precaución se elimina el efecto de choque descrito.

#### 2.3.3. Iluminación

Para que los árboles crezcan en las condiciones de temperatura requerida por el tratamiento, es necesario suministrarles una fuerte intensidad luminosa que, como mínimo, puede cifrarse en 2.000 lux pero que, según Boxus (1970b), en las descripciones de cámaras realizadas por diversos autores, oscila entre 2.000 y 20.000 lux. En realidad, no sólo influye la intensidad luminosa, sino también la calidad o composición espectral de la luz y el fotoperíodo.

La composición espectral de la luz artificial destinada a reemplazar o complementar a la luz natural, tiene una gran importancia (De Groot, 1970). Es preciso evitar, por ejemplo, las lámparas con un exceso de infrarrojos, ya que producen quemaduras (Desvignes, 1970c). Por otra parte, la comparación entre diferentes niveles de intensidad luminosa sólo puede realizarse entre lámparas del mismo espectro, ya que ciertas radiaciones pueden ser nocivas a un nivel en el que otras no lo son (Martelli, 1970b).

En cuanto al fotoperíodo, se admite que el óptimo es de dieciséis horas de luz y ocho horas de oscuridad, si bien no se conoce con exactitud el fotoperíodo óptimo de cada especie a tales temperaturas (Boxus, 1970c). Sólo se sabe que a partir de las dieciséis horas de luz, el suplemento de crecimiento obtenido con un aumento del período luminoso es tan débil que no compensa el gasto suplementario de electricidad. A partir de las veinte horas de luz, el crecimiento disminuye y llega a detenerse por completo, si se ilumina las veinticuatro horas del día (Maroquin, 1970b).



### 2.3.4. Humedad

De igual modo que sucede con la iluminación, los árboles sometidos al tratamiento térmico requieren también, para evitar su deshidratación, una humedad relativa elevada en la atmósfera de la cámara, así como un aporte continuo de agua a nivel de las raíces. Aunque algunos autores opinan que un 50 por 100 de humedad relativa es suficiente (Van Der Meer, 1970a), la mayoría prefiere cifras superiores, entre 50 y 70 por 100 (Martelli, 1970a), o entre 50 y 80 por 100 (Campbell, 1970a), e incluso algunos obtienen los mejores resultados con humedad relativa entre el 90 y 100 por 100, es decir, con una atmósfera prácticamente saturada de agua (Boxus, 1970a; Maroquin, 1970b).

El tipo de lámparas utilizado influye en el nivel de humedad requerido, ya que un espectro rico en infrarrojos exige una humedad relativa mayor, por producir más calor a nivel de los tejidos foliares (Maroquin, 1970b).

### 2.3.5. Nivel de CO<sub>2</sub>

Aun en condiciones luminosas muy buenas (dieciséis horas de luz), puede suceder que el carbono de la planta resulte agotado por la gran intensificación de la actividad respiratoria de los árboles a las temperaturas requeridas por el tratamiento. De ahí que Kristensen (1966) sugiera la adición de CO<sub>2</sub> a la atmósfera de las cámaras, con el fin de estimular la actividad fotosintética.

### 2.3.6. Nutrición

Este factor juega un papel importante antes y durante el tratamiento. Se ha comprobado, y es lógico que así suceda por el incremento de la actividad respiratoria antes citado, que las plantas con más cantidad de reservas sobreviven mejor al tratamiento térmico (Nyland, 1962).

Durante el tratamiento, es muy conveniente que las necesidades de nutrientes se hallen totalmente satisfechas. En algunas especies es frecuente la rápida aparición de deficiencias en hierro a tales temperaturas, por lo que el uso de quelatos es beneficioso (Campbell, 1970a). Sin embargo, hay que ser muy prudentes antes de realizar pulverizaciones foliares, ya sea con hormonas de crecimiento, fungicidas, etc., durante el tratamiento, ya que las altas temperaturas aumentan extraordinariamente la sensibilidad de las hojas frente a los productos químicos, originándose quemaduras fácilmente. Observaciones realizadas con el microscopio electrónico, sobre hojas tomadas durante el tratamiento, han puesto de manifiesto la ausencia de la capa de cera que recubre las hojas normalmente. Ello permite a las sustancias químicas penetrar sin barreras en las células de la epidermis (Campbell, 1970b).

### 2.3.7. Temperatura del sistema radicular

Puesto que la temperatura de 37-38° C se requiere exclusivamente en la parte aérea, todo sistema que permita obtener un enfriamiento a

nivel del sistema radicular, será beneficioso para el crecimiento. En algunas cámaras se consigue un enfriamiento de 10° C mediante un serpentín que recorre el agua de la balsa donde se sitúan las macetas y cubriendo la parte superior de éstas con un material aislante (De Busschere, 1965). Sin embargo, según Maroquin (1970b), 3 ó 4° C de enfriamiento son suficientes y ello puede conseguirse simplemente con agua ligeramente corriente bañando la base de las macetas.

### 2.3.8. Época del tratamiento

Según Maroquin (1970b), a primeros de año, con plantas que salen del reposo vegetativo, se obtienen los mejores y mayor número de ápices injertables. Estos ápices dispondrán, además, de todo el verano para crecer y alcanzar el invierno siguiente en las mejores condiciones. Igualmente, serán los que permitirán un más rápido y completo control del resultado del tratamiento, por producir mayor número de yemas laterales. Por todos los conceptos, pues, ésta es la mejor época para realizar los tratamientos.

### 2.3.9. Susceptibilidad específica al calor

Manteniendo fijos todos los demás factores, las diferentes especies presentan diversos grados de sensibilidad al calor. Para Campbell (1970a), el manzano y el peral se muestran relativamente tolerantes, mientras el ciruelo y el cerezo son bastante sensibles. Para Maroquin (1970b), el orden creciente de sensibilidad es el siguiente:

Especie	Máxima temperatura tolerada
Manzano	39° C.
Ciruelo	37,5° C.
Peral	37° C.
Cerezo	36,5° C.

La diferente situación de peral y ciruelo puede ser achacada a la distinta sensibilidad de las variedades con las que trabajaron ambos investigadores. También Desvignes (1970c) da la lista de sensibilidad que ha obtenido en el curso de sus trabajos. Por orden creciente de sensibilidad: manzano, melocotonero, albaricoquero, almendro, ciruelo, peral y cerezo. Esta lista coincide con la anterior, pero incluye más especies. Como se ve, el manzano aparece siempre como la especie más tolerante y el cerezo como la más sensible.

## 2.4. Instalaciones

Conociendo ya los principales factores que influyen en el crecimiento durante el tratamiento térmico, quedan también definidas la mayoría de las necesidades que deben ser cubiertas por las instalaciones. Estas

deben permitir, en primer lugar, un reglaje reproducible y preciso de las condiciones ambientales deseadas (De Groot, 1970).

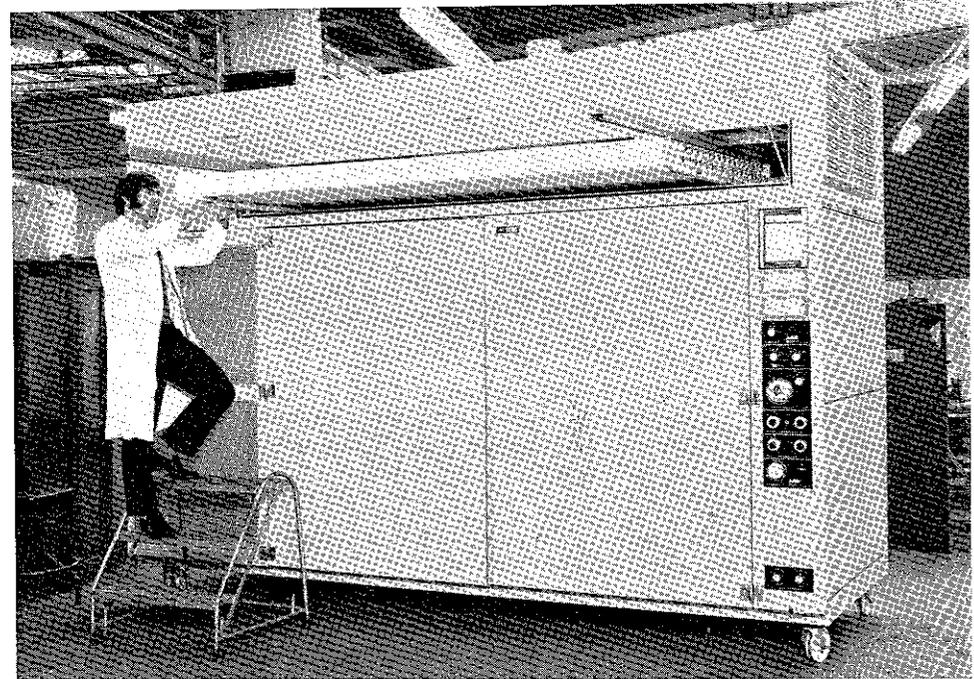
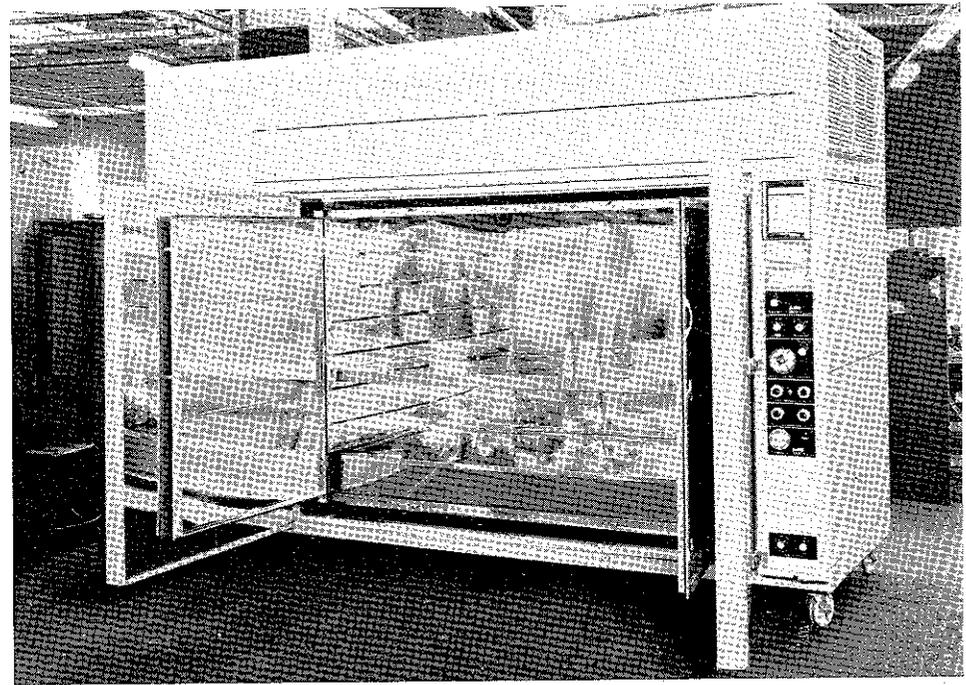
Desde el punto de vista técnico es posible, por supuesto, construir cámaras en las que pueden regularse del modo más riguroso todos los componentes del clima. El único problema es de orden económico. Por otra parte, no es necesario disponer de unas instalaciones tan perfectas para obtener buenos resultados. Existen descripciones de cámaras poco complicadas y baratas (Fridlund, 1962) que dan, al parecer, suficiente satisfacción. El principal defecto de estas instalaciones, que podemos llamar «caseras», es que, al no estar estandarizadas las condiciones de trabajo, es difícil reproducir las experiencias y comparar los resultados de otros laboratorios (Boxus, 1970c).

La principal decisión a tomar, antes de instalar una cámara, es la de si se va a utilizar luz natural o artificial. En realidad, siempre se utiliza luz artificial y la elección está entre si se va a emplear exclusivamente (instalaciones de paredes opacas) o complementando a la natural (instalaciones de paredes transparentes). Algunos autores prefieren la iluminación natural por razones de calidad de la luz y fotoperíodo (Maroquin, 1970b; Campbell, 1970b). Sin embargo, la construcción de cámaras dentro de invernadero plantea difíciles problemas de regulación de temperatura. En los días soleados del verano hay que recurrir al sombreado de la cámara y al enfriamiento por grupo frigorífico, para evitar una elevación excesiva de la temperatura (Boxus, 1970a; Van Der Meer, 1970a). De esta forma, la luz natural es insuficiente y se hace necesario complementarla con la artificial.

En las instalaciones de paredes opacas (a menudo en sótanos), el grupo frigorífico es innecesario y su ahorro compensa el mayor gasto de energía de la iluminación totalmente artificial (Smets, 1970), aparte de simplificar la regulación de temperatura (fotos 1 y 2). Resumiendo (Martelli, 1970b), puede decirse que el empleo de luz artificial permanente es la solución más barata y práctica, mientras que el empleo de luz natural más suplemento de luz artificial, es la solución mejor para el crecimiento.

La elección está también condicionada por el tipo de lámparas a instalar (vapor de mercurio, tubos fluorescentes, etc.) y la intensidad luminosa deseada. Ya vimos en 2.3.3. como ésta variaba en las distintas descripciones entre 2.000 y 20.000 lux. Indudablemente, la obtención de fuertes intensidades luminosas no se logra sin la producción simultánea de una gran cantidad de calor que hay que eliminar (mediante un extractor de aire en la cámara de iluminación), sino se quiere complicar excesivamente la regulación de temperatura (Desvignes, 1970a). Hoy en día es posible, mediante combinaciones de distintos tipos de lámparas, obtener la composición espectral más favorable a una alta actividad fotosintética (Naumann, 1970a). Con ello, las ventajas de la luz natural pierden gran parte de su valor. Otra ventaja de emplear sólo luz artificial es que, si conviene (en zonas o períodos calurosos, por ejemplo), se puede invertir el ciclo luz-oscuridad para facilitar la eliminación del calor producido por las lámparas (Boxus, 1970a).

El calor necesario para el tratamiento puede ser suministrado de muchas maneras. Quizás una de las soluciones más originales, sea la des-



Fotos 1 y 2.—Vista interior y exterior de una cámara de termoterapia tipo armario, de paredes opacas, con el recinto de tubos fluorescentes independiente, para mejor eliminación del calor producido por los mismos. La regulación de temperatura es de este modo muy fácil (Por gentileza de Hucoa-Erlös representante para España de Fisons Scientific Apparatus)

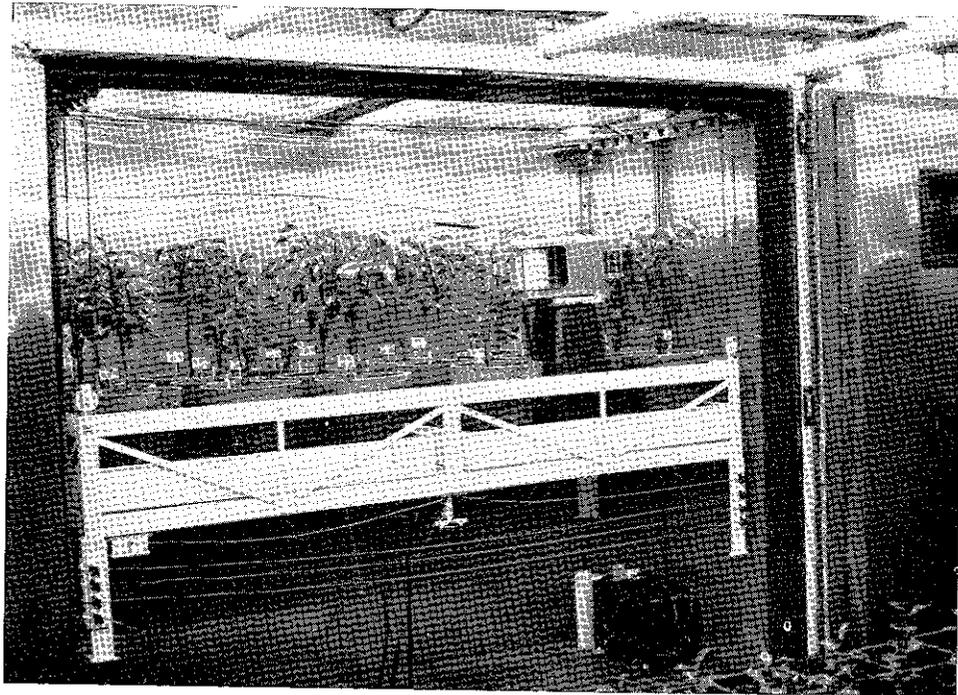


Foto 3—Vista interior de la cámara de paredes opacas, del Centro Técnico Interprofesional de Frutos y Hortalizas de Lanxade (Francia). Se observan los cables eléctricos aislados por teflón para la producción de calor, y la balseta para el riego por capilaridad. (Foto del autor)

crita por Desvignes (1970a): cables eléctricos aislados por teflón blindado, que recorren varias veces el perímetro de la cámara (foto 3). El funcionamiento de los cables, o, en general, de los aparatos productores de calor, se regula a través de termostatos cuya precisión es indispensable para el éxito del tratamiento. Normalmente, no deben existir fluctuaciones superiores a  $\pm 1^\circ \text{C}$ .

El mantenimiento de los altos niveles de humedad relativa señalados en 2.3.4. requiere a menudo el empleo de humidificadores que introducen agua pulverizada en la atmósfera de la cámara (Maroquin, 1970 a). Otros autores afirman que basta la evaporación del agua de riego y la transpiración de las plantas para mantener dichos niveles de humedad (Boxus, 1970a). Posiblemente ello dependa del tipo de riego utilizado. Si se riega manualmente muy a menudo, como lo exige la temperatura del tratamiento, se producen numerosas gotitas de agua que al evaporarse suministran humedad suficiente al aire de la cámara. En cambio, si se recurre al riego por capilaridad, introduciendo la base de las macetas en una balseta permanentemente llena de agua, la evaporación puede no ser suficiente para mantener la humedad requerida.

Aunque el riego por capilaridad puede suponer, como hemos visto, la necesidad de un humidificador, presenta, no obstante, bastantes ventajas. En primer lugar, elimina la necesidad del riego frecuente y manual. En

segundo lugar, haciendo que el agua de la balseta sea ligeramente corriente, el riego por capilaridad sirve para mantener el sistema radicular a temperatura más baja que la de la parte aérea, lo que favorece el crecimiento. Según Maroquin (1970b), sólo si las macetas fueran demasiado pequeñas, habría riesgo de podredumbre de raíces por exceso de agua. Incluso una especie como el melocotonero, tan sensible a la asfixia, puede ser mantenida sin problemas durante tres meses en macetas de 20 cm. de altura, con los 5 cm. de la base permanentemente sumergidos en agua (Desvignes, 1970b).

## 2.5. Multiplicación del material después del tratamiento térmico

Nos referiremos en este apartado únicamente a la multiplicación de los ápices obtenidos después del tratamiento, según el método que hemos llamado «clásico» en 2.1.2., ya que la multiplicación de yemas laterales según el método Nyland, ofrece muchas menos dificultades.

La multiplicación de ápices puede hacerse, en teoría, de dos maneras:

- Injertándolos sobre un portainjerto adecuado (injerto de hendidura)
- Haciéndolos enraizar directamente como si fueran estaquillas.

El estaquillado de los ápices es una práctica cuya utilización se limita al caso de algunos portainjertos, ya que la mayoría de las especies enraízan muy mal en esas condiciones (Campbell, 1970c). Por eso la multiplicación por injerto es la más extendida, aunque el injerto de los ápices sea también problemático.

### 2.5.1. Multiplicación por injerto de hendidura

Los ápices de los brotes crecidos durante el tratamiento térmico, constituyen un material tierno y delicado que dificulta el éxito de la multiplicación. Son varios los factores a tener en cuenta para tratar de aumentar el porcentaje de prendimientos:

— Estado de desarrollo del ápice y del portainjerto: Deben estar en el mismo estado y, puesto que el del ápice es herbáceo y turgesciente, ese deberá ser también el estado del portainjerto (Maroquin, 1970c).

— Edad del portainjerto: Según lo anterior, los mejores resultados deberían obtenerse con los patrones jóvenes de semilla. Sin embargo, no es la edad del patrón la que influye, sino la del brote sobre el que se injerta (Naumann, 1970c). Así pues, los patrones no tienen que ser necesariamente jóvenes, siempre que se rebajen adecuadamente. Lo importante, según Marenaud (1970), es injertar cerca del sistema radicular para obtener el mejor crecimiento.

— Época en que se realiza el injerto: Viene determinada, claro está, por la época en que se realiza el tratamiento y ya dijimos en 2.3.8. que los mejores y mayor número de ápices injertables se obtenían en los tratamientos que se realizaban a primeros de año. Estos ápices se en-

cuentran luego, tras el crecimiento de todo el verano, en las mejores condiciones para pasar el invierno (Maroquin, 1970c).

— Cuidados posteriores al injerto: Es imprescindible proteger los ápices recién injertados contra la desecación. Para ello hay que colocar las plantas en nebulización (Campbell, 1970c) o, en su defecto, recubrir los ápices injertados con pequeñas bolsas de plástico transparente, que serán luego retiradas progresivamente a partir de las tres semanas (Maroquin, 1970c). La atmósfera del interior de las bolsitas puede favorecer los ataques criptogámicos, por lo que antes de colocarlas conviene tratar los ápices con fungicidas. Este tratamiento puede repetirse, si es necesario, retirando momentáneamente las bolsitas. Una vez retiradas definitivamente, hay que seguir protegiendo los ápices en crecimiento de una insolación excesiva (Naumann, 1970b).

Aparte de estos factores controlables, hay que tener en cuenta que no todas las especies tienen la misma facilidad para multiplicarse por injerto apical. Por regla general, el injerto de las especies de hueso es más delicado que el de las especies de pepita y, dentro de las especies de hueso, el cerezo es la que más dificultades presenta (Marenaud, 1970).

### 2.5.2. Multiplicación por estaquillado herbáceo

En los casos en que es posible, la multiplicación de los ápices por estaquillado herbáceo en nebulización presenta numerosas ventajas, eliminando los riesgos del injerto que requiere portainjertos sanos, compatibles, con un estado de desarrollo adecuado y una técnica delicada. De entre los diversos factores que influyen en el éxito del estaquillado, en general, algunos son favorables al material procedente de termoterapia y otros no. Así, por ejemplo:

— El estado de crecimiento del ramo utilizado: A un crecimiento más activo corresponde un mayor rendimiento del estaquillado.

— La edad de la planta madre: Cuanto más joven, mayor porcentaje de estaquillas válidas.

— La posición de la estaquilla en el ramo madre: Al principio del período de crecimiento, las mejores estaquillas son las de la base del ramo (tejidos más diferenciados).

Los dos primeros factores son favorables a un buen enraizamiento del material procedente de termoterapia, ya que este material es joven y se halla, obligatoriamente, en una fase de crecimiento activo. El último factor, por el contrario, es desfavorable, dado el carácter indiferenciado de los ápices. Por lo tanto, incluso si los otros factores son muy favorables, no deben esperarse tampoco rendimientos muy elevados en la multiplicación de los ápices por estaquillado herbáceo (Monin, 1970).

### 2.5.3. Problemas comunes a ambos métodos

Los problemas de la multiplicación de los ápices no terminan una vez prendidos por injerto o enraizados. Pueden producirse todavía algunos hechos que lleven al fracaso toda la operación. Señalaremos por ejemplo:

— La transformación de las yemas vegetativas en botones de flor, como resultado de una interrupción demasiado prolongada del crecimiento. Esto es especialmente grave en el género **Prunus**, cuyas yemas o son vegetativas o son de flor, pero nunca mixtas, como en el género **Malus**.

— La falta de rusticidad de las plantas de cara al invierno siguiente. Frente a ambos problemas conviene (Monin, 1970):

— Realizar los injertos o estaquillados tempranamente: Si la yema terminal reemprende pronto su crecimiento, no hay peligro de que se diferencie a flor. Ello permitirá, igualmente, completar un ciclo completo de crecimiento y, por lo tanto, un buen agostamiento.

— Evitar paradas de vegetación (por defectos de riego, temperatura, fotoperíodo, etc.) que podrían provocar la diferenciación de las yemas y retrasarían el agostamiento.

## 2.6. Factores que influyen en el porcentaje de curación

Una vez multiplicado el material procedente del tratamiento térmico, hay que comprobar los efectos del mismo, ya que la curación no se produce nunca en el 100 por 100 de los casos.

La comprobación se lleva a cabo mediante las técnicas habituales del indexaje para la detección e identificación de virosis (Morvan, 1971). Es importante haber realizado dicho indexaje antes del tratamiento, en primer lugar, para poder determinar la duración del mismo, ya que ésta depende del o de los virus presentes, y, en segundo lugar, para poder verificar posteriormente los porcentajes de curación.

Para ganar tiempo y no tener que esperar demasiado para efectuar dicha verificación, una buena técnica consiste en dejar desarrollar un brote anticipado por debajo del ápice injertado. Con él podrán llevarse a cabo los indexajes necesarios, reservando íntegramente el crecimiento del ápice para la multiplicación. Algunas especies, como el melocotonero, forman anticipados espontáneamente. En otras, como el manzano, puede provocarse su formación haciendo una incisión por encima de una yema (Marenaud, 1970). Por supuesto que lo más rápido es utilizar, siempre que sea posible, un portainjerto para la multiplicación que sea al mismo tiempo un indicador de virosis (Nyland, 1962), por ejemplo el melocotonero GF 305.

De todas formas, tampoco conviene precipitarse en comprobar la curación, ya que ello podría conducir a conclusiones erróneas. En efecto, los ápices resultantes del tratamiento puede que no estén completamente libres de virus, sino que contengan un número de partículas virales tan pequeño que ningún indexaje precoz pueda poner de manifiesto. Por ello, los indexajes de control deben prolongarse al menos dos años, para dar tiempo a la reinvasión progresiva del material en los casos que no haya habido eliminación total (Bernhard y Marenaud, 1970).

El porcentaje de curación depende de varios factores:

— Método utilizado: El método que hemos llamado «clásico» (aprovechamiento de los ápices únicamente), conviene más a los frutales de



hueso, sobre todo a los de crecimiento más rápido (melocotonero, ciruelo japonés, albaricoquero). El método Nyland, por el contrario, tiene difícil aplicación a los frutales de hueso, ya que debe realizarse en reposo y éste es rápidamente interrumpido por el calor en esas especies. En cuanto a la variante preconizada por Hunter et al. (1958), sólo es aplicable a virus muy inestables de los frutales de pepita (Bernhard y Marenaud, 1970).

— Duración del tratamiento: Está en función, sobre todo, de los virus a eliminar. Dentro de ciertos límites, el porcentaje de curación aumenta rápidamente con un incremento de la duración (de veinte a treinta días, por ejemplo). Pasados estos límites, el porcentaje de curación aumenta muy poco, aunque se alargue mucho el tratamiento (de treinta a sesenta días por ejemplo, Campbell, 1970e). Puede suceder incluso que el porcentaje de curación descienda al aumentar la duración del tratamiento, por la aparición de mutantes resistentes al calor (Welsh y Nyland, 1965). Los tratamientos largos pueden inducir también mutaciones en la planta (anomalías de crecimiento, deformaciones) que inutilizan el tratamiento (Campbell, 1970d).

— Época del tratamiento: Según Campbell (1970e), el mayor porcentaje de curación se obtiene con los tratamientos realizados en abril, que es la época que más favorece también al crecimiento de la planta durante el tratamiento y su posterior multiplicación. Según Van Der Meer (1970b), en cambio, la época más favorable desde el punto de vista del porcentaje de curación, se sitúa entre los meses de agosto y diciembre.

— Longitud de los ápices: Se admite que no se deben utilizar ápices de más de 1 cm. de longitud, si no se quiere correr el riesgo de obtener un material todavía contaminado (Maroquin, 1970c). Sin embargo, la longitud del fragmento libre de virus depende mucho de la naturaleza de éste (Campbell, 1970e). Así por ejemplo, mientras el virus del mosaico del manzano queda eliminado en una longitud de casi 60 cm., el virus del «Spy decline» sólo desaparece de la yema apical. Según esto, cuando se disponga de poco material para comprobar el porcentaje de curación, se obtendrá una buena indicación del mismo verificando únicamente la ausencia de «Spy decline».

Del conjunto de estos factores se deduce que, en definitiva, el porcentaje de curación depende, fundamentalmente, del huésped a tratar y de los virus a eliminar. El huésped determina, o al menos limita, la elección del método a utilizar. A su vez el método condiciona a menudo la época del tratamiento. Los virus a eliminar, por su parte, determinan la duración del tratamiento y la longitud del material que se podrá dedicar a la multiplicación.

## 2.7. Rendimiento y coste de la termoterapia

El rendimiento de la termoterapia es muy aleatorio todavía, debido al gran número de factores que intervienen simultánea o sucesivamente. Algunos de estos factores escapan aún a nuestro control o se controlan poco rigurosamente. Hemos visto en los apartados anteriores todas las fases del largo proceso. La planta a regenerar debe sufrir un período de habi-

tuación previa a la vida en maceta, debe crecer luego en unas condiciones límites de temperatura, multiplicarse a continuación por procedimientos nada fáciles y comprobarse, finalmente, que la curación ha sido un hecho y que, salvo su estado sanitario, el clon conserva todas sus características. Un fallo en cualquiera de estas fases, desde una mala preparación del material inicial hasta la posibilidad de mutaciones en el material final, representa la inutilización de todo el proceso.

Por otro lado, la termoterapia es relativamente costosa. Requiere instalaciones y mano de obra especializada y años de espera. Aunque es muy difícil fijar el coste de la regeneración de una variedad, éste puede cifrarse, según varias estimaciones (Bernhard y Marenaud, 1970; C.T.I.F.L., 1971), entre 25.000 y 30.000 pesetas como mínimo.

Uniendo el coste a la aleatoriedad de los resultados, se deduce que la termoterapia está justificada solamente cuando se aplica a un material de alto valor agronómico y comercial, afectado por virosis de incidencia económica grave.

Para reducir la aleatoriedad de los resultados habría que disminuir en primer lugar el empirismo que hoy en día reina en la aplicación de los tratamientos. En efecto, la termoterapia se ha desarrollado de una forma totalmente empírica. Sucesivos éxitos y fracasos han marcado el rumbo a seguir para obtener los resultados deseados, sin que en la mayoría de los casos, pueda explicarse el porqué. Haría falta conocer los niveles óptimos de la intensidad luminosa, el fotoperíodo, la humedad, la concentración de CO<sub>2</sub>, etc., a altas temperaturas y para cada especie. De esta forma podrían mejorarse los rendimientos, sobre todo para las especies más delicadas como el cerezo (Boxus, 1970c).

Puesto que el estudio de todos estos factores no puede ser hecho simultáneamente con la rigurosidad necesaria, es indudable que sólo por la suma de los esfuerzos de muchos investigadores podrá avanzarse por este camino. Aparece aquí la importancia de que en todas las publicaciones sobre termoterapia figuren descritas de forma precisa las condiciones experimentales utilizadas. Esto vale tanto para las experiencias terminadas con éxito como para aquellas que fracasen. Sólo así podrán ser comparados los resultados de forma efectiva.

Un paso más decisivo en la lucha contra el empirismo actual de la termoterapia, sería el poder llegar a comprender cuál es el modo de acción de la temperatura sobre la multiplicación de los virus de las plantas. Es éste el punto que vamos a tratar brevemente para finalizar nuestra revisión del estado actual de conocimientos sobre la termoterapia.

## 2.8. Modo de acción del calor sobre la multiplicación de los virus de las plantas

La explicación más simplista que puede pensarse «a priori» es que el calor actúe directamente sobre el virus inactivándolo. Esta primera explicación debe, sin embargo, ser desechada rápidamente por cuanto se sabe que en una gran parte de casos no se produce la inactivación del

virus, sino, simplemente su inmovilización, recuperando el virus su actividad en cuanto cesa el tratamiento. Por otro lado, las temperaturas de inactivación de los virus «in vitro» son bastante más elevadas que las que se utilizan en los tratamientos de termoterapia.

Otra explicación más verosímil es la que se funda en las modificaciones que sufre el metabolismo del huésped a las temperaturas del tratamiento. Puesto que los virus no pueden multiplicarse más que utilizando la «maquinaria» del huésped, en particular su mecanismo de síntesis proteica, es lógico pensar que toda modificación del ritmo de multiplicación de los virus dentro de una planta, tiene que ser consecuencia de una modificación de dicho mecanismo celular. Esta explicación es la sostenida por Wu y Rappaport (1961), quienes, tras estudiar el efecto del calor sobre el virus del mosaico del tabaco, concluyeron que el bloqueo de la multiplicación viral se debía a la pérdida de capacidad celular para soportar la infección, a causa de la desnaturalización de sustancias de tipo proteico que el virus necesita para su multiplicación. Esta desnaturalización se produciría, según los citados autores, independientemente de la presencia del virus.

Una experiencia realizada por Yarwood y Holm (1962) parece confirmar la teoría anterior: cuando hojas de haba infectadas por el virus de la necrosis del tabaco fueron sometidas a 55° C. durante cortos períodos (de cinco a veinte segundos), el virus soporta luego el calor durante cuatro veces más tiempo que en las hojas no tratadas previamente. El virus, aparentemente, se había hecho resistente al calor por efecto del pre-tratamiento. Sin embargo, cuando el virus superviviente del tratamiento térmico fue inoculado a otras hojas de haba no pre-tratadas, su resistencia al calor no fue mayor de lo normal. La resistencia al calor no radicaba, por tanto, en el mismo virus, sino en las hojas del huésped.

Otros estudios más recientes (Hirth, 1970) han puesto de manifiesto que, en realidad, el efecto del calor sobre la multiplicación de los virus es una resultante de la interacción entre la planta y el virus.

En un huésped determinado, cada cepa viral tiene una temperatura óptima de desarrollo a la cual adquiere su máximo poder patógeno. Ello se debe a que a tal temperatura hay una gran correlación entre la cantidad sintetizada de ácido ribonucleico (ARN) viral y de la proteína que debe envolverlo para formar las partículas virales completas. Cuando nos alejamos de la temperatura óptima, dicha correlación disminuye, produciéndose un exceso de proteínas de la envuelta cuyo poder infeccioso es nulo.

Parece, pues, como si el calor actuara sobre el funcionamiento de los enzimas que intervienen en la «replicación» del ARN viral. Aunque éste deje de sintetizarse, la síntesis proteica puede continuar mientras el ARN inicial, portador del código genético viral, no sea destruido. Esta teoría permite explicar la aparición de cepas mutantes, las cuales no son inducidas por el calor, sino simplemente seleccionadas entre la población de cepas preexistentes al tratamiento. Los mutantes «cálidos», es decir, los seleccionados a altas temperaturas, suelen ser poco virulentos, afortunadamente. Los mutantes «fríos», en cambio, suelen ser muy virulentos.

### 3. La quimioterapia

No podemos terminar este trabajo sin hacer referencia a los intentos de utilización de sustancias químicas como método curativo de las virosis en las plantas. Es posible que la quimioterapia llegue a desplazar en el futuro a la termoterapia que presenta, como ya hemos visto, numerosos inconvenientes: lentitud y aleatoriedad en la obtención de los resultados, coste relativamente elevado y posibilidad de selección de mutantes favorecidos, en vez de frenados, por el calor.

Sin embargo, hoy por hoy, la quimioterapia sólo constituye un método experimental poco desarrollado que tiene alguna utilidad en aplicación simultánea con los métodos anteriores. Así, por ejemplo, la aplicación de algunas sustancias (el 2,4-D, el ácido indolacético) permite aumentar el fragmento de ápice libre de virus, con lo que mejoran las posibilidades del cultivo de meristemos (Quak, 1961, en patata). Otra posibilidad de la quimioterapia, es como tratamiento complementario de la termoterapia, buscando la reducción del tiempo de aplicación del calor y, por lo tanto, disminuyendo el riesgo de la selección de mutantes resistentes (Nyland, 1962).

Muchos tipos de sustancias diferentes se han ensayado hasta ahora. Muchas de ellas tienen efectos negativos sobre la multiplicación viral, pero la mayoría los tienen también sobre la multiplicación celular y son, por lo tanto, fitotóxicas. Sólo en algunos casos existe un margen en la dosificación que permite actuar únicamente sobre el virus sin dañar a la planta. El efecto de estas sustancias sobre la síntesis viral puede ser directo o indirecto (Kummert y Semal, 1970):

— Efecto directo es el de las sustancias llamadas «análogas» de las bases púricas o pirimidínicas, componentes esenciales del ARN, y de los aminoácidos que constituyen las proteínas. Las sustancias análogas (el 2-thiouracilo, la 8-azoguanina, el 2,6,8-tricloropurina, etc.) tienen una estructura química muy semejante a la de estos componentes esenciales de las partículas virales. Al introducirse en la cadena del ARN y en la de los enzimas necesarios para la síntesis viral, falsean el modelo genético del virus y bloquean su mecanismo de «replicación».

— Efecto indirecto es el de las sustancias que aumentan la actividad celular o actúan sobre los ribosomas, haciendo que la competencia para la utilización de estos o de los precursores (nucleótidos, aminoácidos) en la síntesis del ARN y de las proteínas, sea favorable al huésped. Otro tipo de efecto indirecto es el de algunas sustancias que provocan la activación de un mecanismo de interferencia de la planta (inducción de interferón).

Con todas estas sustancias sólo se ha conseguido, por ahora, el restablecimiento temporal de brotes en crecimiento. Estos deben ser separados de la planta tratada, como en el caso de la termoterapia, para obtener una nueva planta sana. La quimioterapia, por tanto, tampoco es aplicable en el campo. Cada una de estas sustancias es, además, muy específica para cada combinación virus-huésped, por lo que los resultados obtenidos para una combinación no pueden ser extrapolados a otra. Por otro lado, el efecto inhibitorio sólo existe, a menudo, cuando el tratamiento

se aplica poco tiempo antes o después de la inoculación del virus, desapareciendo por completo cuando la infección está ya instalada.

Ante estos inconvenientes se comprende que la quimioterapia no avanzará en tanto no se encuentre el tipo de sustancia ideal, que debería ser sistémica, es decir, capaz de penetrar y difundirse de modo estable en la planta, y no fitotóxica, al menos dentro de un margen no demasiado estrecho de dosificación.

#### 4. Referencias bibliográficas.

BAKER K F

1962: «Thermotherapy of planting material». **Phytopath.**, 52 (12): 1244-55.

BAKER R PHILLIPS, D J.

1962: «Obtaining pathogen-free stock by shoot tip culture». **Phytopath.**, 52 (12): 1242-4.

BERNHARD, R MARENAUD C

1970: «Quelques réflexions sur la thermothérapie chez les arbres fruitiers». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**, Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 95-104

BOXUS P

1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie de la Station des Cultures Fruitières et Maraichères de Gembloux (Belgique)». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**, Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 19-20.

1970b: «Brèves descriptions de quelques chambres à thermothérapie» Discussion **Idem:** 35-8

1970c: «Conclusions à la Table Ronde sur la thermothérapie des espèces ligneuses». **Idem:** 158-60.

CAMPBELL A I

1962: «Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation» **Nature**, 195: 520.

1970a: «Factors affecting growth during heat treatment» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**, Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 40-5

1970b: «Facteurs influençant la croissance des plantes en cours de traitement». Discussion **Idem:** 63-8

1970c: «La multiplication du matériel après traitement à la Station de Long Ashton» **Idem:** 85-8

1970d: «Multiplication du matériel après le traitement» Discussion **Idem:** 89-93

1970e: «Le taux de guérison et la position du bourgeon la durée et l'époque du traitement». **Idem:** 104-10

CTIFL

1971: «La thermothérapie des espèces fruitières Un service proposé aux professionnels» **CTIFL-Documents**, 31: 2 pp

DE BUSSCHERE P J

- 1965: «La production d'arbres fruitiers sans virus aux pépinières Georges Delbard à Malicorne (Allier)» **Pepinièr., Horticult., Maraich.**, 60: 3005-8

DE GROOT A

- 1970: «Les chambres climatiques pour la thermothérapie des plantes». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 10-8.

DESVIGNES, J C

- 1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie du Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Centre de Lanxade, Prignonrieux (France)» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 22-7.
- 1970b: «Brèves descriptions de quelques chambres à thermothérapie» Discussion **Idem**: 35-8
- 1970c: «Facteurs influençant la croissance des plantes en cours de traitement» Discussion **Idem**: 63-8

FRAZIER N W VOTH V BRINGHURST

- 1965: «Inactivation of two strawberry viruses in plant grown in a natural high-temperature environment» **Phytopath.**, 55 (11): 1203-5

FRIDLUND, P R

- 1962: «An inexpensive heat chamber for curing virus diseased plants» **Plant Dis. Rep.**, 46 (10): 703-5

FRY P R

- 1970: «Elimination of viruses from apples and pears». **The Orchardist of N. Z.**: 2 pp.

GALZY R

- 1964: «Techniques de thermothérapie des viroses de la vigne» **Ann. Epiphyties**, 15: 245-56.

HIRTH L

- 1970: «Mode d'action de la température sur la multiplication des virus des plantes». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 129-48.

HOLLINGS M STONE O M

- 1968: «Techniques and problems in the production of virus-tested planting material» **Scient. Hort.**, 20: 57-72

HOLMES, F O

- 1960: «Cure of rose mosaic by heat» **Phytopath.**, 50 (4): 240 (abstr)

HOUTEN J G QUAK F VAN DER MEER, F A

- 1967: «Heat treatment and meristem culture for the production of virus free plant material». **Neth. J. Pl. Path.**, 74: 17-24.

24

HUNTER J A CHAMBERLAIN E E ATKINSON I D.

- 1958: «Note a modification in technique for inactivating apple mosaic virus in apple wood by heat treatment» **N. Z. J. Agric. Res.** 1958: 117-22

KASSANIS B.

- 1965: «Therapy of virus-infected plants». **J. Roy. Agr. Soc. England**, 126: 105-14

KRISTENSEN H R

- 1966: «Viroses des plantes et thermothérapie» **Horticultura**, 20 (12): 171-80.

KUMMERT J SEMAL J

- 1970: «Considérations sur les possibilités de la lutte chimiothérapeutique en virologie végétale» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 113-23

KUNKEL L O

- 1936: «Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of peach» **Phytopath.**, 26: 809-30.

MARENAUD C DUNEZ J

- 1969: «Méthodes curatives de lutte contre les viroses des arbres fruitiers» **Phytoma**, 204: 26-31.

MARENAUD C KERAMIDAS C

- 1969: «Séparation par thermothérapie du Virginia Decline et de six autres infections virales du pommier» **Ann Phytopathol.**, 1 (4): 645-52.

MARENAUD, C, SAUNIER, R.

- 1969: «Un exemple de thermothérapie sur pêcher» **Phytoma**, 204: 32-8

MARENAUD, C.

- 1970: «Multiplication du matériel après le traitement» Discussion. **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 89-93

MAROQUIN C

- 1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie du Centre de Recherches de Gorsein (Belgique)». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 27-9.

- 1970b: «Facteurs influençant la croissance des plants en cours de traitement» **Idem**: 45-56

- 1970c: «Multiplication du matériel après le traitement» **Idem**: 79-82

MARTELLI, G.

- 1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie de l'Institut Phytopathologique de l'Université de Bari (Italie)» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 29

25

1970b: «Facteurs influençant la croissance des plantes en cours de traitement» Discussion. **Idem**: 63-8.

MONIN A

1970: «Multiplication du matériel après le traitement» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Gran-Manil. Gembloux: 70-6

MORVAN G

1971: «Les maladies à virus des arbres fruitiers». **Arboric. fruit.**, 18 (206): 36-43; (211): 40-52 Traducido en **ITEA** (1973), 13: 22-46

MURASHIGE, T. BITTERS W P RANGAN T S. NAUER E. M ROISTACHER. C. N. HOLLIDAY P B

1972: «A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free **Citrus** clones» **HortScience**, 7 (2): 118-9

NAUMANN, G

1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie de l'Institut für Obstbau und Gemüsebau der Universität Bonn, Deutschland». **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 29-31

1970b: «The grafting of apple plants after treatment» **Idem**: 82-4.

1970c: «Multiplication du matériel après le traitement». Discussion **Idem**: 89-93

NYLAND G

1960: «Heat inactivation of stone fruit ring sport virus» **Phytopath.**, 50 (5): 380-2

1962: «Thermotherapy of virus infected fruit trees» **Proc. Vth Eur. Symp. Fruit Tree Virus Dis.**, Bologna: 156-60.

PEÑA A. AYUSO P

1973: «Consideraciones sobre técnicas inhibitorias (quimioterapia) y regenerativas (termoterapia microinjerto *in vitro*) en la producción de plantas leñosas (albaricoquero) libres de patógenos obligados (virus y micoplasmas)». **Comunicación al V Simp. Inter. Albaricoquero**, Madrid.

POSNETTE, A. F CROPLEY R WOLFSWINKEL L D

1962: «Heat inactivation of some apple and pear viruses». **Rep. E. Malling Res. Sta.**, 45: 445-54.

PUTZ C.

1970: «Quelques données concernant la thermothérapie du framboisier» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des Cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 153-7

QUAK F.

1961: «Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants» **Adv. Hort. Sci. Applic.**, 1: 144-8.

1970: «Review of heat treatment and meristem tip culture as methods to obtain virus-free plants». **Proceedings of the 18th Inter. Hort. Congress.** Tel-Aviv Vol III: 12-25.

SMETS L.

1970: «Brèves descriptions de quelques chambres à thermothérapie» Discussion **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 35-8

TRAYLOR J. A WILLIAMS H. E NYLAND G

1967: «Heat therapy of rose mosaic». **Phytopath.**, 57 (10) (Abstr.)

VAN DER MEER F. A.

1970a: «Brève description de la chambre à thermothérapie de l'Institut de la Recherche Phytopathologique de Wageningen (Hollande)» **Table Ronde «La thermothérapie des espèces ligneuses»**. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil Gembloux: 33-4

1970b: «Seasonal influence on virus elimination in apple during heat treatment». **Idem**: 111-13

WELSH M F NYLAND G

1965: «Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat» **Can. J. Plant. Sci.**, 45: 443-54.

WINTER H F.

1965: «A heat therapy technique for freeing apple clones from chlorotic leaf spot virus» **Phytopath.**, 55 (10): 1084 (Abstr.).

WU J. H RAPPAPORT J.

1961: «Kinetic study of the heat inactivation of tobacco mosaic virus infected centers and potentially infectible sites on *nicotiana glutinosa*». **Phytopath.**, 51 (12): 823-6

YARWOOD, C E, HOLM E W.

1962: «Heat adaptation in a rust and a virus» **Phytopath.**, 52 (7): 709-12

