

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Erradicación de Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) en cebolla Shallot (Allium cepa var. Aggregatum), mediante el Cultivo de meristemas, quimioterapia y termoterapia para la producción de bulbos libres de virus.

Trabajo de Investigación.

Sofía Catalina Heredia Guerrero

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en procesos Biotecnológicos

Quito, 3 de mayo de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

*Erradicación de Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) en cebolla Shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum*), mediante el Cultivo de meristemas, quimioterapia y termoterapia para la producción de bulbos libres de virus.*

Sofía Catalina Heredia Guerrero

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Venancio Arahana, PhD.

Firma del profesor

Quito, 3 de mayo de 2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Sofía Catalina Heredia Guerrero

Código: 00104201

Cédula de Identidad: 1716385750

Lugar y fecha: Quito, 3 de mayo de 2016

Dedicatoria

Dedico este trabajo a los dos pilares fundamentales de mi vida: MIS PADRES.

Sin ustedes, este, ni muchos de mis logros fueran posibles.

Gracias no solo por ser mis padres, amigos y consejeros;

sino también gracias por ser ese ejemplo tangible de vida,

amor, comprensión, respeto y trabajo duro.

Este es un paso más de muchos que quedan por delante

y que espero siempre sean su orgullo.

Les amo.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por las bendiciones recibidas en mi vida. Agradezco a mi familia, mis padres, hermanos, cuñadas y sobrinos, que han estado en el día a día durante esta etapa de mi vida. Entre risas, alegrías y llantos, han sido parte importante de este camino que estoy culminando. Gracias por ser siempre esa familia unida que nunca deja de apoyar y sacar sonrisas en todo momento.

Gracias a mis Biotecs, que durante este camino largo y que de repente parecía imposible de seguir, me dieron ánimos para seguir adelante y terminar esta que es nuestra pasión. A cada uno de ustedes los llevo en mi corazón y recuerdos. Gracias en especial Piwi, Natito, Nini, Anita Clau, Pollito, Juan, Gaby Gavilanes, Sandy; por todos los momentos compartidos, risas y afecto que han tenido conmigo, nunca olviden que cada uno tiene un lugar especial en mi corazón.

Gracias a cada uno de los profesores que dejaron una marca en mí, a los que su enseñanza fue siempre valorada. Su don de ser maestros, lo llevo siempre conmigo.

Gracias Rosi y Edison, por ser siempre un apoyo. Cami, Emi, gracias por siempre estar ahí para mí en las buenas y malas. Las quiero.

Abschließend möchte ich Julian herzlich danken. Du warst unerlässlich auf diesem Weg. Danke für deine Liebe, Zuneigung und Unterstützung. Danke für deine Geduld, deine beruhigenden Worte und deine Ehrlichkeit. Dieses Kapitel meines Lebens ist beendet und ein neues beginnt für uns. Ich liebe dich!

Resumen

La cebolla Shallot (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) es apetecida en la industria gastronómica por su alto contenido de sólidos totales, ácidos grasos y azúcares. También tiene potenciales aplicaciones medicinales por sus propiedades antimicrobianas, antitrombóticas, y anticancerígenas. Un limitante para la producción de Shallot son las infecciones virales, como las causadas por el virus OYDV, un *Potyvirus* que afecta el crecimiento y desarrollo de este tipo de cebollas, reduciendo la producción de esta variedad hasta en un 50%. Para resolver este problema, se debe erradicar el virus OYDV de las plantas infectadas a fin de obtener bulbos libres de virus que sirvan como material inicial para los siguientes ciclos de cultivo. Una estrategia para conseguir esto es el cultivo de meristemas, o el uso de este método de cultivo junto con tratamientos de termoterapia y quimioterapia. El objetivo del presente estudio fue probar las metodologías mencionadas, para la erradicación del virus OYDV en cebolla Shallot de la familia A17 de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Se utilizaron 100 bulbos de esta familia, a partir de los cuales se obtuvieron discos basales en medio (MS) suplementado con, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 3 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹, NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. y de éstos, se aislaron meristemas apicales. Los meristemas fueron cultivados en un medio de regeneración (MS) suplementado con, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1.5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹, NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. Siguiendo luego una fase de enraizamiento en medio (MS) suplementado con, sacarosa 30 g.L⁻¹, y agar 7g.L⁻¹, seguidos por embulbamiento en un medio (MS) adicionado sacarosa 30g.L⁻¹, 150mg L⁻¹ de NaH₂PO₄, agar 7g.L⁻¹ y 10uM de Ancymidol. Finalmente las plantas pasaron por un proceso de aclimatación.

El tratamiento de termoterapia consistió en cultivar los meristemas a 38° C por 4 días y el de quimioterapia en cultivar los meristemas en el medio de regeneración más 50 mg/L Ribavirina. Además se realizó un tratamiento de terapias combinadas 38° C por 4 días y 25 mg/L Ribavirina en el medio de regeneración. Antes y después de los tratamientos se verificó la presencia de virus OYDV mediante RT-PCR. Los tratamientos más eficientes para la erradicación de virus OYDV, fueron la quimioterapia y terapias combinadas con 100% de erradicación, seguidas por termoterapia (60%) y control (53%). De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que los tratamientos de quimioterapia y de terapias combinadas son aconsejables para obtener plantas de cebolla Shallot libres del virus OYDV. Es aconsejable optimizar el protocolo de regeneración in vitro de meristemas para obtener un número mayor de bulbos de Shallot que puedan ser utilizadas para mejorar la producción de este tipo de cebolla con interesantes usos en la industria culinaria.

Abstract

Shallot onions (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) are highly used and valued in gastronomy, due to its high content of total solids, fatty acids and sugars. It also has potential for medical applications because of its antimicrobial, antithrombotic and anti carcinogenic properties. Obstacles found for the production of Shallot are viral infections like the ones caused by OYDV virus. OYDV is a *Potyvirus*, which affects the growth and development of this type of onions, reducing its production up to 50%. To solve this issue, OYDV virus should be eliminated with the aim of obtaining free virus bulbs, which can serve as initial material for the next culture cycle. A strategy to accomplish this is meristem culture, or the use of this method with treatments such as thermotherapy and chemotherapy. The objective of the present study was to test the mentioned methodologies, for OYDV virus elimination from Shallot onions of the family A17 from the Experimental Farm of University San Francisco de Quito (USFQ). One hundred bulbs from this family have been used to obtain basal discs in a (MS) medium supplemented with saccharose 30 g.L⁻¹, benomyl 3 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹, NAA 1,1uM + BAP 8,9uM; from these, apical meristems have been isolated. The meristems were cultured in a regeneration medium (MS) supplemented with saccharose 30 g.L⁻¹, benomyl 1.5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹, NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. Following then, by a rooting-stage in a (MS) medium, supplemented with saccharose 30 g.L⁻¹ and agar 7g.L⁻¹; followed by a bulb-stage formation in a (MS) medium, supplemented with saccharose 30g.L⁻¹, 150mg L⁻¹ of NaH₂PO₄, agar 7g.L⁻¹ and 10uM of Ancymidol. Finally, the plants passed through a process of acclimatization.

The treatment of thermotherapy consisted on culturing the meristems at 38° C for 4 days and chemotherapy in culturing the meristems in the regeneration culture with 50 mg/L of Ribavirin. In addition, a treatment of combined therapies was applied to the meristems at 38° C for 4 days and 25 mg/L Ribavirin in the regeneration medium. Before and after the therapies, the OYDV virus presence was verified through RT-PCR. The most efficient treatments for OYDV virus elimination were chemotherapy and combined therapies with both 100% of OYDV virus elimination, followed by thermotherapy (60%) and control (53%). According to the obtained results, it can be said that the treatments of chemotherapy and combined therapies are advisable to obtain free Shallot onions of OYVD virus. It is also recommended to optimize the protocol of in vitro regeneration of meristems, to get a larger number of Shallot bulbs. These can be used to improve the production of this type of onion with interesting uses in the gastronomic industry.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	14
1.1. Género <i>Allium</i>	14
1.2. <i>Allium cepa</i>	14
1.3. <i>Allium cepa</i> var <i>Aggregatum</i>	14
1.4. <i>Allium cepa</i> var <i>Aggregatum</i> en el Ecuador.....	15
1.5. Enfermedades de la cebolla Shallot.....	15
1.6. Virus	16
1.7. Detección de virus	16
1.8. Erradicación de virus.....	17
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Justificación.....	20
4. Área de estudio.....	21
5. Materiales	22
5.1. Material Vegetal y ruptura de dormancia.....	22
5.2. Introducción in vitro de discos basales.....	22
5.2.2. Cultivo in vitro de meristemas apicales	22
5.2.3. Termoterapia	23
5.2.4. Quimioterapia.....	23
5.2.5. Terapias Combinadas	23
5.2.6. Aclimatación de plantas	23
5.3. Identificación de virus OYDV	24

6. Métodos	26
6.1. Toma de muestras de cebolla Shallot infectadas de virus	26
6.3. Enraizamiento.....	28
6.4. Embulbamiento	28
6.5. Aclimatación	28
6.6. Tratamientos para la erradicación viral	29
6.6.1. Tratamiento de termoterapia	29
6.6.2. Tratamiento de quimioterapia	29
6.6.3. Tratamiento de terapias combinadas (termoterapia y quimioterapia)	29
6.7. Comprobación de la infección viral por RT-PCR	30
6.8. Toma de datos	31
7. Resultados	32
7.1. Recuento del material vegetal inicial disponible y evolución durante el cultivo in vitro	32
7.2. Detección de virus OYDV en las plántulas antes del tratamiento	33
7.3. Eficiencia de los tratamientos para la erradicación del virus OYDV.....	34
7.3.1. Termoterapia	34
7.3.2. Quimioterapia.....	34
7.3.3. Terapias combinadas	34
7.3.4. Control o cultivo de meristemas.....	34
8. Discusión	35
8.1. Cultivo de meristemas apicales de cebolla Shallot	35
8.2. Eficiencia de los tratamientos para la erradicación de virus OYDV.....	37
8.3. Determinación del mejor tratamiento para erradicación de virus OYDV en cebolla Shallot.....	43

8.4. Análisis económico para la detección de virus OYDV.....	44
9. Conclusiones	46
10. Recomendaciones.....	47
11. Referencias bibliográficas	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Datos generales de material vegetal.....	53
Tabla 2 Registro de meristemas..	53
Tabla 3 Meristemas diagnosticados.	54
Tabla 4 Registro de meristemas para la aclimatación.	54
Tabla 5 Porcentaje de eliminación de virus OYDV.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de extracción de meristema.....	55
Figura 3 Gel de agarosa muestras iniciales..	56
Figura 5 Porcentaje de eficiencia de terapias.	57
Figura 8 Gel de agarosa muestras luego de tratmientos.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Detalle de los meristemas apicales de cebolla Shallot.....	59
Anexo 2 Concentración de ARN extraído.....	60
Anexo 3 Registro de meristemas en tratamiento por termoterapia.	61
Anexo 4 Registro de meristemas por terapias combinadas.....	62
Anexo 5 Registro de meristemas en tratamiento por quimioterapia.....	63
Anexo 6 Registro de meristemas apicales (control).....	64

1. Introducción

1.1. Género *Allium*

Dentro del Género *Allium* existen cerca de 750 especies, las cuales a pesar de diferenciarse por su sabor, color y apariencia, son similares a nivel bioquímico y fitoquímico (Rivlin, 2001; Sharma, 2015). Dentro del Género *Allium*, se encuentran especies importantes para la economía y la salud. *Allium* es conocido por especies como *A. sativum* L (*ajo*), *A. ampeloprasum* L (*puerro*) y *A. cepa* (*cebolla*) (Herischwgger, 2010).

1.2. *Allium cepa*

Allium cepa, o cebolla, es una de las hortalizas de mayor producción a nivel mundial debido a su uso en la gastronomía, así como por sus propiedades nutraceuticas apreciadas dentro del campo médico (Currah L.; Proctor, F.; 1990). Como indica Sharma (2015), la cebolla es apreciada en la gastronomía debido a su durabilidad y versatilidad como ingrediente en comidas. Esto ha provocado que la cebolla sea aceptada en variedad de culturas e integrada a todo tipo de platillos. En cuanto al campo médico, las cebollas son apreciadas debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas; antitrombóticas, anticancerígenas, entre otras (Sharma, 2015). Estas propiedades se deben a compuestos como flavonoides y ACSOs (Alkyl Cysteina Sulfoxidos), que generan los característicos colores, sabores y olores de las cebollas (Sharma, 2015).

1.3. *Allium cepa* var *Aggregatum*

Allium cepa var. *Aggregatum*, también conocida como cebolla Shallot, es una especie monocotiledónea, posee bulbos con varios catafilos, los cuales se generan a partir del disco basal y recubren el meristema apical. Las hojas tienen forma de espada hueca en el centro. Shallot, tiene grupos de bulbos unidos por un disco basal, a diferencia de otras variedades de *Allium cepa*, como la cebolla común, que tiene un bulbo único (Sinclair, P; 1988).

La razón por la cual la cebolla Shallot es tan apreciada en la gastronomía internacional, es debido a su alto contenido de sólidos (16-33%), como ácidos grasos, azúcares y compuestos sulfurados, en contraste con la cebolla común que posee 7-15% de sólidos (Currah y Proctor, 1990). La cebolla Shallot posee además de sus apreciadas propiedades organolépticas, actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias Gram-positivas (Santas et al., 2010; Currah y Proctor, 1990).

1.4. *Allium cepa* var *Aggregatum* en el Ecuador

En el Ecuador, la cebolla Shallot es cultivada principalmente en las Provincias de Carchi, Tungurahua y Chimborazo. Debido a su color, es considerada como una variedad de cebolla paiteña o cebolla roja (MAGAP, 2012). Su producción anual es de alrededor de 67,000 toneladas, la cual no es suficiente para cubrir la demanda nacional, por lo que se importa esta variedad principalmente desde el Perú (SINGAP, 2014). La cebolla Shallot cultivada en el país se utiliza para venta de mercado, autoconsumo y como material inicial para la propagación vegetativa (SINGAP, 2014).

1.5. Enfermedades de la cebolla Shallot

La cebolla Shallot es propensa a distintos tipos de plagas y enfermedades, entre las cuales se destacan hongos, como *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*; plagas, como *Delia antiqua* y orugas; y virus, como Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) y Shallot Latent Virus (SLV). Si bien las primeras pueden ser manejadas mediante rotación del cultivo, buenas prácticas de agricultura y aplicación de productos químicos (EPPO, 2001), las infecciones virales son más complejas y difíciles de erradicar (Majumder, S. et, al.; 2008). Durante el almacenamiento, los bulbos de cebolla Shallot pueden verse afectados por bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Enteritidis* los cuales causan su deterioro (Benkeblia, N., 2004)

1.6. Virus

1.6.1. *Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV)*

El virus OYDV, Onion Yellow Dwarf Virus, pertenece a la familia *Potyviridae*. La detección fenotípica de la infección viral por OYDV en *Allium* consiste en la observación de la sintomatología de la enfermedad, la cual incluye manchas amarillentas, flacidez y achatamiento de las hojas; sin embargo, ésta no es una sintomatología única de infección por este virus (OYDV), ni un rasgo presente en todos los individuos infectados (Majumder, 2008). En cebolla Shallot, este virus produce manchas amarillentas tipo mosaico y deformaciones en las hojas, como doblez, achatamiento y flacidez. Esto conduce a una reducción del tamaño del bulbo y a su deterioro en almacenamiento, así como apareamiento precoz de la raíz. En plantas de Shallot, productoras de semillas, el virus causa manchas en las hojas tipo mosaico, distorsión de los estambres de las flores y reducción del número de flores y semillas. Este virus es transmitido por diversas especies de áfidos y por contacto con tejidos dañados (BIOREBA, 2011).

A escala mundial, este virus tiene una incidencia del 50% en la producción de bulbos de Shallot. Sin embargo, en países tropicales, donde la única forma de propagación de esta es de tipo vegetativo, esta incidencia es mayor (Hailekidan et al., 2013; Diekmann, 1997).

1.7. Detección de virus

Los dos virus, OYDV y SLV que atacan a la cebolla Shallot, poseen genoma de RNA de sentido positivo envuelto por una proteína que forma la cápside. Ambos se transmiten por medio de áfidos y su reservorio son todas las especies del genero *Allium* (Diekmann, 1997). La detección visual o fenotípica de estos virus se realiza observando los síntomas en las hojas y bulbos y se confirma mediante métodos serológicos como Enzyme Linked

Inmunoabsorbent Assay (ELISA) y métodos moleculares basados en RT-PCR. Este último tiene mayor sensibilidad que las pruebas de ELISA (Shahraeen et al., 2008).

Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay (ELISA), es una técnica serológica utilizada para medir concentraciones de anticuerpos o antígenos en una solución (Abd Serotec, 2016). Para el diagnóstico del virus OYDV en *Allium sativum*, como en *Allium cepa*, esta técnica es comúnmente utilizada. Sin embargo, esta técnica puede tener sus limitaciones si no se conoce el anticuerpo específico del virus, así como la tecnología para la producción del anticuerpo, siendo esto especialmente crítico si las infecciones virales de OYDV y SLV ocurren simultáneamente (Fletcher, 1998).

Debido a esta dificultad, se ha optado por otras técnicas de identificación de virus como RT-PCR o PCR de retro-transcripción. Este es uno de los métodos más sensibles para la detección de RNA viral, debido a que involucra el uso de primers específicos para el virus a diagnosticar. La retro transcripción in vitro permite sintetizar cadenas complementarias de DNA (DNAc) a partir del RNA de interés. Luego se amplifica el ADN del virus OYDV mediante PCR. La presencia de bandas de 601pb en gel de agarosa es señal positiva de presencia del virus OYDV (Majumder et al., 2008).

1.8. Erradicación de virus

Los métodos de erradicación de virus en plantas, pueden ser biológicos (cultivo de meristemas apicales), físicos (termoterapia), y químicos (quimioterapia).

1.8.1. Cultivo de meristemas apicales

El cultivo de meristemas apicales consiste en aislar el meristema apical del bulbo y cultivarlo in-vitro bajo protocolos previamente estandarizados. El meristema apical se caracteriza por ser un domo compuesto por células totipotentes, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tejidos para formar una planta completa (Thorpe T., Vasil;

1994). El éxito de este método de limpieza de virus radica en no incluir junto al meristema, tejidos vascularizados por los cuales los virus se transportan a grandes distancias en la planta. Además, estos tejidos poseen plasmodesmos o conexiones citoplasmáticas entre células contiguas, por los cuales se transmiten los virus de célula a célula (Vieira et al., 2015; Fletcher, et al., 1998).

1.8.2. *Termoterapia*

La termoterapia es un tratamiento físico, utilizado para la erradicación de virus en especies de plantas. Este consiste en tratar al meristema durante un tiempo determinado, con temperaturas más altas que la temperatura normal en la que se cultivan las plantas de las que proviene el meristema. Expuestos a temperaturas entre 35-40°C, dependiendo del hospedador, los virus son sensibles a este tratamiento. Como indican Taskin et al. (2013), la termoterapia como método de eliminación de virus, tiene como objetivo, inhibir la capacidad de los virus en ensamblar proteínas de la cápside, degradándolas a temperaturas altas y evitando la infección de otras células de las plantas (Díaz et. al, 2007).

1.8.3. *Quimioterapia*

La quimioterapia consiste en la utilización de antivirales como la Ribavirina (Sigma Aldrich), un nucleósido sintético, que se fosforila en los plasmodesmos de la célula vegetal infectada utilizando la enzima adenosinquinasa. Esto inhibe la síntesis del ARN mensajero viral, la ARN polimerasa y la transcriptasa inversa en altas concentraciones, evitando de esta manera la proliferación del virus (Sigma Aldrich, 2015). Estudios previos reportan una eficiencia del 80-100% de erradicación de virus en cebollas y ajos (Soliman et al, 2012; Robledo-Paz, A y Tovar-Soto M; 2012).

1.8.4. Terapias combinadas, termoterapia y quimioterapia

Este tratamiento consiste en combinar las condiciones de termoterapia con las de quimioterapia. Si bien con esta última se alcanza un porcentaje alto de erradicación de virus, se utiliza las terapias combinadas para aumentar la eficiencia y reducir la cantidad del antiviral a usar (Soliman et al, 2012). Esta optimización de protocolos de erradicación viral para OYDV en cebollas Shallot, permite a partir de termoterapia obtener un porcentaje de individuos libres de virus OYDV aumentando la eficiencia de este tratamiento con antiviral para una eliminación total del virus OYDV (Fletcher et al., 1998).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Optimizar el protocolo de limpieza del virus OYDV en cebolla Shallot mediante el uso de quimioterapia y termoterapia y con combinación de ellas.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la eficiencia del tratamiento de termoterapia para la erradicación del virus OYDV en cebolla Shallot, de la familia A17 proveniente de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.
- 2) Establecer la eficiencia del tratamiento de quimioterapia para la erradicación del virus OYDV en cebolla Shallot, de la familia A17 proveniente de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.
- 3) Evaluar el efecto combinado de las dos terapias, termoterapia y quimioterapia, para la erradicación del virus OYDV en cebolla Shallot, de la familia A17 proveniente de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.

3. Justificación

El ataque de virus OYDV tiene un gran impacto económico en el cultivo de cebolla Shallot porque reduce hasta el 50% de la producción por hectárea de esta especie (Shiboleth et al, 2001). Esto, en países tropicales como el Ecuador, se agrava dado el método de propagación por bulbos de la cebolla, de tipo vegetativo, provoca la acumulación de diversos virus (Taskin et al., 2013). En Ecuador, la cebolla Shallot se cultiva en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua (MAGAP, 2012), con una producción anual nacional de 67000 T y una superficie cultivada de 1750 hectáreas (SINAGAP, 2013). Sin embargo, la cantidad producida a nivel nacional no alcanza a cubrir la demanda interna lo que obliga a la importación desde Perú (INEC, 2012). Por esta razón, es necesario incrementar la producción de esta cebolla, no solo para satisfacer el mercado interno, sino también para exportar al mercado mundial que tiene una alta demanda (INEC, 2012).

La erradicación del virus OYDV en países tropicales es difícil; el único método disponible para esto es el cultivo de meristemas junto con termoterapia o quimioterapia (Fletcher et al., 1998). En un estudio previo se obtuvo un 55% de erradicación de virus OYDV únicamente por termoterapia (Vega, 2015). Por esta razón, se ha planteado el optimizar esta erradicación de virus OYDV al incluir quimioterapia como tratamiento. El optimizar un método de erradicación de virus, permitirá producir bulbos libres de estos patógenos, con una eficiencia alta de un 80-100% de erradicación de virus OYDV (Neeraj, V, et al., 2005). A partir de este material vegetal obtenido, se podría generar cultivos de cebolla Shallot libre de virus.

4. Área de estudio

Las cebollas Shallot empleadas en este estudio, son variedades élite (familia A17) de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito, ubicada en el Km 15 vía Interoceánica, en Tumbaco. La familia A17, es una familia de cebollas que provienen de un programa de mejoramiento realizado en la Granja Experimental de la universidad. Los bulbos de esta familia provinieron de un bulbo inicial, con características consideradas élite; como son: mayor tamaño de bulbo y mayor tiempo de almacenamiento (Conexiones, USFQ, 2015). Estas variedades ya han sido utilizadas en estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito y se tiene conocimiento que están infectados por virus OYDV (Vega, 2015).

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal se realizaron los ensayos de termoterapia, quimioterapia y terapias combinadas para la erradicación de virus OYDV, así como la toma de datos y análisis de los mismos.

5. Materiales

5.1. Material Vegetal y ruptura de dormancia

- Bulbos secos de Shallot de la familia A17 de la Granja Experimental de la USFQ
- Refrigerador (Lab Line Ili)
- Fundas de papel

5.2. Introducción in vitro de discos basales

5.2.1. *Desinfección de bulbos*

- Hipoclorito de sodio 4,5%
- Etanol 70%
- Agua destilada estéril
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Autoclave (Trident EA632)
- Cernidor
- Frascos de vidrio

5.2.2. *Cultivo in vitro de meristemas apicales*

- Frascos de vidrio de 477mL y 534 mL para medios de cultivo
- Tubos de ensayo de vidrio de 50mL
- Medio MS (Murashige & Skoog,1962) pH 5.8
- Potenciómetro (Orion Star A111 Thermo Scientific™)
- Ácido naftalenacético- NAA (Sigma)
- 6-Benzylaminopurina-BA (Sigma)
- Ancymidol (Sigma)
- Benomyl (Agripac)

- Bacto Agar (DIFCO)
- Sacarosa
- Estereomicroscopio (Thermo Scientific)
- Balanza analítica (Sartorius LA230S)
- Cámara de flujo laminar (Labconco)
- Cámara de fotos (Canon EOS Rebel)
- Etanol 70%
- Cajas petri de vidrio estériles

5.2.3. Termoterapia

- Cámara de control de temperatura (MaxQ 400 Barnstead Lab Line)
- Meristemas apicales de Shallot en medio de inducción (MS suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM),

5.2.4. Quimioterapia

- Ribavirina (Sigma Aldrich)
- Meristemas apicales de Shallot en medio de inducción (MS suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM),

5.2.5. Terapias Combinadas

- Ribavirina (Sigma Aldrich)
- Meristemas apicales de Shallot en medio de inducción (MS suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM)
- Cámara de control de temperatura (MaxQ 400 Barnstead Lab Line)

5.2.6. Aclimatación de plantas

- Tierra (Tierra de la Granja Experimental de la USFQ)

- Agua destilada estéril
- Vasijas de barro
- Frascos de vidrio de 1900mL

5.3. Identificación de virus OYDV

5.3.1. Extracción de ARN total

- TRIzol® (Invitrogen)
- Etanol 75%
- Isopropanol 99,5% (Sigma)
- Nitrógeno líquido
- Cloroformo 99,8% (Sigma)
- Agua tratada con DEPC (Invitrogen)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415D)
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)
- Tubos Eppendorf
- Pipetas (BioPette Labnet)
- Mortero de cerámica

5.4. Cuantificación de ARN total

- NanoDrop (Thermo scientific 1000)
- Pipetas (BioPette Labnet)
- Agua tratada con DEPC (Invitrogen)

5.5. Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa 2% (SeaKem)
- TBE 10X (108g/L Tris, 55g/L ácido bórico, 7,49g/L EDTA)

- SYBR safe (10.000X, Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder de 100 bp (Axygen)
- Cámara de electroforesis horizontal (Scientific Co. MGU-502T)
- Fotodocumentador (BIO-RAD)

5.6. Síntesis de cDNA

- ARN total extraído (100ng.L⁻¹)
- Primer reverse: 5'CGATTAGCTGCCCCTCTAAC3' (Mahmoud et al., 2007)
- SuperScript III (Invitrogen)
- 5X First-Strand Buffer (Invitrogen)
- Ditioneitol DTT (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138 (Biometra)

5.7. Amplificación de ADN viral mediante PCR

- cADN Viral producto de la retrotranscripción
- 10x PCR Amplification Buffer (Invitrogen)
- MgCl₂ (Invitrogen)
- dNTPs (Invitrogen)
- Primer reverse 5'CGATTAGCTGCCCCTCTAAC3' (Mahmoud et al, 2007)
- Primer forward: 5`CGAACGAAATTGCCAAGCAG3(Mahmoud et al, 2007)
- DNA Taq Polimerasa (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138 (Biometra)

6. Métodos

6.1. Toma de muestras de cebolla Shallot infectadas de virus

En la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito, se identificó visualmente plantas de cebolla Shallot de la familia A17 infectadas con virus OYDV y de ellas se colectó bulbos, siguiendo los lineamientos establecidos por la FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm (Diekmann, 1997). Los bulbos colectados fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal para su procesamiento.

6.2. Cultivo de meristemas apicales para la erradicación del virus OYDV

6.2.1. Medios de cultivo utilizados

El medio de regeneración, utilizado para el cultivo de discos basales y de meristemas apicales, consistió de las sales Murashige- Skoog (MS), suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl (3 g.L⁻¹ para discos basales y 1,5 g.L⁻¹ para meristemas apicales), agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. El medio para embulbamiento fue el MS adicionado sacarosa 30g.L⁻¹, 150mg L⁻¹ de NaH₂PO₄, agar 7g.L⁻¹ y 10uM de Ancymidol estéril (por filtración). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 y se esterilizó en auto clave por 20min a 121° C y 100KPa.

6.2.2. Tratamiento de frío de bulbos Shallot

Cien bulbos de Shallot de la familia A17, previamente sometidos a un proceso de secado, fueron almacenados en cuarto frío a 4°C por cuatro semanas. Este tratamiento se realizó para romper la dormancia de los bulbos y facilitar la brotación en el medio de cultivo (Fletcher et al., 1998).

6.2.3. Introducción de discos basales a medio de cultivo

Para esto, se utilizó 95 bulbos de Shallot, ya que los 5 restantes presentaron contaminación, luego del tratamiento de frío. Se lavó los bulbos con agua corriente para eliminar tierra y otras impurezas. Dentro de la cámara de flujo laminar, se cortó los bulbos transversalmente de los cuales se obtuvieron 117 discos basales de 5-7 mm de altura; a los cuales se los sumergió en etanol 70% por 10min y en NaClO 4,5% por 30min, para finalmente realizar tres lavados con agua destilada estéril. Se desechó los catafilos exteriores y se colocó los discos basales en frascos de vidrio de 500mL en los cuales había 60mL de medio de cultivo (MS, suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 3 g.L⁻¹ para discos basales, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM). Se colocó 5 discos basales por frasco. Las condiciones de incubación en el cuarto de cultivo fueron de 16 horas de fotoperiodo y 22-24° C.

6.2.4. Aislamiento y cultivo de meristemas

Antes del aislamiento, cuando emergieron hojas de los discos basales y alcanzaron aproximadamente 2-3 cm de altura, fueron cortadas y colocadas en congelación (-20° C) para posteriormente realizar extracción del ARN y verificar la presencia del virus mediante RT-PCR (ver Sección 6.2.1).

Para el aislamiento de meristemas se siguió el protocolo estandarizado por Ramírez (2013)(Figura 2). Utilizando el estereomicroscopio se retiró gradualmente los catafilos externos del disco basal hasta dejar solo el meristema acompañado de dos primordios foliares. Se sembró un meristema en cada tubo de ensayo de vidrio de 50 mL, conteniendo 17 mL de medio (MS), suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. Dado que cada bulbo posee más de un meristema apical, a partir de 117 discos basales cultivados (ver Sección 6.3.3), se extrajo 120 meristemas apicales. 30

meristemas se usaron para termoterapia, 30 para quimioterapia, 30 para terapias combinadas y 30 para control. Los meristemas obtenidos fueron identificados por códigos, de un número y una letra; el número identificaba el disco basal del que provenía el meristema, y la letra el orden de extracción del meristema desde el disco basal. Por ejemplo, un código 20d, significa, disco basal número 20 y “d” cuarto meristema apical extraído del disco basal.

6.3. Enraizamiento

Después de la aplicación de los distintos tratamientos, se pasaron las plántulas a medio MS basal (MS más sacarosa 30 g.L^{-1} , y agar 7g.L^{-1}) para el enraizamiento. Se las mantuvo en este medio por 4-6 semanas como indica Kahane et al (1991). Las condiciones del cuarto de cultivo fueron 16 horas luz y $22\text{-}24^\circ \text{C}$.

6.4. Embulbamiento

Se pasaron las plántulas al medio de embulbamiento (MS) adicionado sacarosa 30g.L^{-1} , 150mg L^{-1} de NaH_2PO_4 , agar 7g.L^{-1} y 10uM de Ancyimidol a 4°C estéril (por filtración), donde se las mantuvo por 4 semanas. Las condiciones del cuarto de cultivo fueron 16 horas de luz y $22\text{-}24^\circ \text{C}$.

6.5. Aclimatación

Luego de 6 semanas, cuando los bulbos alcanzaron un diámetro entre 10mm a 15mm, se realizó el proceso de aclimatación, siguiendo el protocolo utilizado por Vega (2015). Se sacó la planta del medio de embulbamiento, se lavó la raíz repetidas veces con agua destilada, hasta eliminar completamente residuos de medio de cultivo y se la trasplantó en macetas de barro pequeñas que contenían sustrato proveniente de la Granja de la USFQ, previamente esterilizado. Cada maceta se colocó en el interior de un frasco de vidrio de 3L de capacidad el cual se cerró con PlasticWrap (Saos et al., 2002). Luego de dos días se realizó orificios al plástico para modificar las condiciones de humedad dentro del frasco. Esto se realizó hasta

lograr tener las mismas condiciones de humedad dentro y fuera del frasco, regándolas constantemente cuando fue necesario. Luego se pasaron las plantas a macetas grandes y se cultivaron en el invernadero.

6.6. Tratamientos para la erradicación viral

6.6.1. Tratamiento de termoterapia

Se siguió el protocolo establecido por Soliman et al., (2012) y estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal por Vega (2015). Se incubaron los meristemas en medio (MS), suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM, a 38°C por cuatro días, luego pasaron los meristemas a condiciones normales del cuarto de cultivo (16 horas luz, 22-24° C).

6.6.2. Tratamiento de quimioterapia

Se incubaron los meristemas en medio (MS), suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM. y se adicionó 50 mg.L⁻¹ del antiviral Ribavirina (Sigma Aldrich) (Robledo-Paz, A y Tovar-Soto M, 2012) a 16 horas luz, 22-24°C, durante las cuatro semanas de tratamiento.

6.6.3. Tratamiento de terapias combinadas (termoterapia y quimioterapia)

Se incubaron los meristemas en medio (MS), suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM., adicionando 25 mg.L⁻¹ del antiviral Ribavirina (Sigma Aldrich), a 38°C por cuatro días (Su Chuang y Wen-Shann, 1994). Luego se pasaron los meristemas a condiciones normales del cuarto de cultivo (16 horas luz, 22-24° C) (Soliman et al., 2012).

6.7. Comprobación de la infección viral por RT-PCR

Antes de iniciar los ensayos de erradicación del virus OYDV, se comprobó la presencia del virus por medio de RT-PCR, con primers específicos diseñados en base a secuencias conservadas de la región no codificante de la proteína de la cápside. Para el virus OYDV las secuencias de los primers reportados por Mahmoud et al. (2007) son: forward 5'CGAAGCAAATTGCCAAGCAG3' y reverse 5'CGATTAGCTGCCCTCTAAC3'.

6.7.1. Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA se usó las hojas brotadas de los discos basales cultivados in vitro (ver Sección 6.3). Se siguió el procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal a base de Trizol (Vega, 2015). Se trituró 100mg de hojas frescas en mortero con nitrógeno líquido, luego se transfirió a un tubo Eppendorf con 1 mL de Trizol (Invitrogen). Se centrifugó a 12000rpm a 4°C por 15 min, rescatando luego la fase líquida, a la cual se le agregó 240uL de cloroformo. Se dejó reposar por 3 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 500 uL de isopropanol, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 15 min. Se descartó toda la fase líquida, luego se lavó el pellet resultante con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm por 10 min. Se retiró todo el etanol remanente y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar por 10 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en 50 uL de agua tratada con DEPC (libre de RNAsas) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.7.2. Síntesis de la primera hebra de ADN viral o cDNA

Se mezcló para cada reacción, 100 ng de RNA total, Primer reverse 0,2uM y 20 U de retrotranscriptasa M-MuLV (SuperScript III, Invitrogen). Se realizó la denaturación inicial a 65°C por 10min. Luego se agregó DNTPs mix 0,5uM, 1X First-Strand Buffer y DTT 10 mM.

el volumen total de reacción fue de 20uL. Se incubó por 1h a 48°C en el termociclador y se inactivó la enzima calentando la mezcla a 70°C por 15 min.

6.7.3. Amplificación mediante PCR

La mezcla de reacción, en un volumen final de 10 uL, contenía, 1uL de producto de la retrotranscripción como templado, 1X Buffer, 0,2uM de dNTP mix, 1,5mM de MgCl₂, 0,2uM de cada primer y 2,5U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen). El ciclado térmico para la amplificación del ADN de OYDV fue: 10min a 95°C, después 30 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 61°C y 1min a 72°C, extensión final 5min a 72°C.

6.7.4. Electroforesis en gel de agarosa y fotografiado del gel.

Los productos de la amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% y teñidos con SyberSafe® (10.000X, Invitrogen). El gel fue preparado con agarosa (SeaKem) disuelta en 1X buffer TBE. Se usó el ladder 100 pb (Invitrogen). Las condiciones de corrida fueron 80v por una hora. Se fotografió el gel utilizando un transiluminador UV con un software para captura de imagen (Biorad XR documentation system). Una banda de 601 pares de bases (pb) en el gel, fue considerada como señal positiva para la presencia de virus OYDV como indica Majumder et al (2008).

6.8. Toma de datos

Mientras duró cada experimento, se tomó datos de contaminación y explantes muertos o que no regeneraron. Al final de cada experimento se determinó el número de plantas libres de virus para cada tratamiento mediante RT-PCR.

7. Resultados

7.1. Recuento del material vegetal inicial disponible y evolución durante el cultivo in vitro

De la Granja experimental de la Universidad San Francisco de Quito, se recibió 100 bulbos de cebolla Shallot previamente secados. De éstos, al momento de la recepción 5 presentaron infección fúngica (Figura 2) y fueron descartados. Luego de las 4 semanas de tratamiento en frío, 30 bulbos adicionales presentaron infección por hongos y también fueron descartados, quedando 65 bulbos para los ensayos de erradicación del virus OYDV (Tabla 1).

De los 65 bulbos, se obtuvieron 117 discos basales, los cuales fueron desinfectados y cultivados en medio MS más diferentes concentraciones de hormonas (véase Sección 6.3.2). A la semana de cultivados, se observó 69 discos basales contaminados, quedando solo 48 discos basales para la extracción de meristemas (Tabla1, Figura 2).

De los 48 discos basales restantes, se obtuvieron 120 meristemas apicales (Tabla 1), pues en la mayoría de casos se pudo extraer más de un meristema por disco basal (Anexo 2) (Figura 2) y se distribuyó 30 meristemas para cada tratamiento.

De los 30 meristemas de termoterapia, luego del tiempo de tratamiento se descartaron 15 meristemas por muerte o contaminación. Los restantes 15 meristemas fueron a embulbamiento (Tabla 2). Al terminar el proceso de embulbamiento, 15 plantas fueron diagnosticados para virus OYDV (Tabla 3). Únicamente 4 de estas plantas diagnosticadas presentaron tamaño de hojas y raíces suficientes para el paso a aclimatación (Tabla 4).

De los meristemas 30 meristemas tratados por quimioterapia, luego del tiempo de tratamiento, 8 meristemas fueron descartados por muerte o contaminación. Los restantes 22 meristemas pasaron a embulbamiento (Tabla 2). Al terminar el proceso de embulbamiento, 5 plantas fueron descartadas por muerte y 17 plantas fueron diagnosticados para virus OYDV

(Tabla 3). Únicamente 10 de estas plantas diagnosticadas presentaron tamaño de hojas y raíces suficientes para el paso a aclimatación (Tabla 4).

De los 30 meristemas destinados a terapias combinadas, luego del tiempo de tratamiento, 7 meristemas fueron descartados debido a muerte o contaminación. Los 23 meristemas restantes continuaron a embulbamiento (Tabla 2). Al terminar el proceso de embulbamiento, 7 plantas fueron descartadas por muerte y 16 plantas fueron diagnosticados para virus OYDV (Tabla 3). Únicamente 7 de estas plantas diagnosticadas presentaron tamaño de hojas y raíces suficientes para el paso a aclimatación (Tabla 4).

Por último, de los 30 meristemas destinados a control, es decir cultivo de meristemas sin terapias adicionales, se descartó 10 meristemas luego del tiempo de tratamiento debido a contaminación o muerte. Los 20 meristemas restantes pasaron a embulbamiento (Tabla 2). Al terminar el proceso de embulbamiento, 4 plantas fueron descartadas por muerte y 16 plantas fueron diagnosticados para virus OYDV (Tabla 3). Únicamente 5 de estas plantas diagnosticadas presentaron tamaño de hojas y raíces suficientes para el paso a aclimatación (Tabla 4).

Las plantas aclimatadas se mantienen en crecimiento en el invernadero de la Universidad San Francisco de Quito.

7.2. Detección de virus OYDV en las plántulas antes del tratamiento

De Las 48 plántulas obtenidas a partir de discos basales, el 100% de ellas fueron positivas para infección con virus OYDV (Figura 3). El anexo 2, muestra la calidad de estas muestras diagnosticadas.

7.3. Eficiencia de los tratamientos para la erradicación del virus OYDV

7.3.1. Termoterapia

De los 30 meristemas que fueron sometidos a termoterapia, 50% (15/30) se contaminaron o no desarrollaron plántulas. Las 15 plantas restantes fueron evaluadas, de las cuales 40% (6/15) presentaron la banda de 601pb que indicaba que estaban infectados de virus, 60% (9/15) no presentaron la banda de 601pb indicando que estaban libres de virus OYDV (Anexo 3, Figura 4).

7.3.2. Quimioterapia

De los 30 meristemas que fueron sometidos a quimioterapia, 43% (13/30) no fueron diagnosticados por muerte o contaminación. Por esta razón, solo 17 plantas fueron evaluadas y ninguna presentó infección por virus OYDV, lo cual representa 100% (17/17) de plantas libres de virus OYDV (Anexo 4, Figura 4).

7.3.3. Terapias combinadas

De los 30 meristemas que fueron sometidos al termoterapia y quimioterapia combinadas, 47% (14/30) no fueron diagnosticados por muerte o contaminación. De las 16 plantas evaluadas, ninguna presentó virus, lo que representa 100% (16/16) de plantas libres de virus OYDV (Anexo 5, Figura 4).

7.3.4. Control o cultivo de meristemas

Finalmente, de los 30 meristemas que no recibieron tratamientos adicionales, 43% (13/30) no fueron diagnosticados por muerte o contaminación. De las 17 plantas fueron evaluadas, se obtuvo 47% (8/17) de plantas que estaban infectadas de virus OYDV y 53% (9/17) resultaron libres de virus, (Anexo 6, Figura 7).

8. Discusión

8.1. Cultivo de meristemas apicales de cebolla Shallot

En zonas tropicales como Ecuador, la propagación de cebolla Shallot se realiza de forma vegetativa y la brotación de bulbos ocurre después de algunos meses, debido al fenómeno de dormancia, es decir al período en el cual la planta entra a un estado de reposo de crecimiento dado por condiciones climáticas (Hailekidan et al., 2013; Bufler, 2009). En este estudio, los bulbos iniciales secos se colocaron en frío a 4°C durante 4 semanas, para inducir la ruptura de dormancia e incentivar la brotación de meristemas apicales (Vega, 2015). Como indica Benkeblia, et.al (2004) el tratamiento en frío a 4°C, inactiva la producción de fenoles en los bulbos, promoviendo así su brotación.

En el presente estudio, se obtuvo un porcentaje de regeneración de meristemas de 66%, mientras que el estudio de Vega (2015), se obtuvo 78% de regeneración con un tiempo previo de 4 semanas en frío sometidos a los bulbos para la ruptura de dormancia. En cuanto al porcentaje de aclimatación, para este estudio se obtuvo un porcentaje de 22% de plantas aclimatadas y crecimiento en el invernadero, mientras que el estudio de Vega (2015), presentó un 50% de aclimatación efectiva; es decir en crecimiento y engrosamiento en tierra. El protocolo de cultivo in vitro que se siguió en los dos estudios fue el establecido por Vega (2015). El material vegetal para estos experimentos, tanto de Vega (2015) como el actual, provino de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco, pero de diferente familia a la del estudio realizado por Vega (2015) la cual fue la familia A18, mientras que en el presente estudio, fue la familia A17. Por esta razón, se esperaba que el porcentaje de regeneración de las plantas no fueran similares, ya que como fue antes explicado, la brotación de cebolla Shallot va a variar dependiendo del genotipo de la variedad (Bufler, 2009). Por otro lado el estudio de Ramírez (2013) obtuvo un 43% de regeneración de plántulas, y no

presentó porcentaje de aclimatación. Esta diferencia de porcentaje de regeneración y aclimatación, puede deberse al periodo de ruptura de dormancia; debido a que los bulbos utilizados para este estudio y el de Ramírez fueron la misma familia (A17) de cebolla Shallot provenientes de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito. La ruptura de dormancia promueve la brotación de bulbos de cebolla Shallot al inhibir compuestos fenólicos de la planta. En el estudio de Ramírez (2013), no se realizó la ruptura de dormancia, a diferencia de este, lo que puede haber sido un factor para la eficiencia de regeneración y aclimatación (Bufler, 2009).

Se colectaron 100 bulbos iniciales secas a partir de las cuales 95 fueron viables para la etapa de frío. Es importante indicar que el material vegetal inicial recibido presentó infección en la parte interna del bulbo, lo cual se evidenció a medida que avanzaba el experimento.

Después de las 4 primeras semanas de cultivo de meristemas, en el tratamiento de termoterapia se produjo un 50% (15/30) de muerte o contaminación y 50% de plantas aptas para diagnóstico y continuación del protocolo de cultivo in vitro. Para el tratamiento de quimioterapia se produjo 43% (13/30) de muerte o contaminación y 57% (17/30) de plantas aptas para diagnóstico de virus OYDV y continuación del protocolo de cultivo in-vitro. En el tratamiento de terapias combinadas, se produjo 47% (14/30) de muerte o contaminación y el restante 53% (16/30), de plantas aptas para el diagnóstico de virus OYDV y continuación del protocolo de cultivo in-vitro. Finalmente para control, o aislamiento de meristemas sin adición de otros tratamientos, se produjo 43% (13/30) de muerte o contaminación y el restante 57% (17/30) fueron plantas aptas para diagnóstico de virus OYDV y continuación del protocolo de cultivo in-vitro (Tabla 5).

Durante el tiempo en medio de enraizamiento, se comenzó a observar cambio en la apariencia de las hojas de la mayoría de las plantas, como cambio de color, textura, estancamiento de desarrollo de las hojas, por lo que se tomó material vegetal para realizar

análisis molecular de detección de virus OYDV. Esto provocó que no se siga el protocolo establecido por Vega (2015) para la mayoría de plantas. Esto pudo haber provocado que el tiempo de enraizamiento establecido por Vega (2015), no fue el suficiente para un enraizamiento y crecimiento similar de las plantas, a lo reportado por Vega.

Luego del tiempo establecido en el protocolo de Vega (2015), únicamente 22% (26/120) meristemas regeneraron en plantas, con tamaño de raíces y hojas adecuadas para el paso de aclimatación. Este porcentaje bajo se debe a la muerte y contaminación que se presentó en las primeras 4 semanas de tratamientos. Así también debido a que de la mayoría de plantas, durante el tiempo de enraizamiento se tomó material vegetal para análisis molecular debido al cambio de color y textura de las hojas; pudiendo haber afectado el desarrollo posterior de las plantas.

8.2. Eficiencia de los tratamientos para la erradicación de virus OYDV.

8.2.1. Detección del virus OYDV y material vegetal inicial

Luego del tiempo de introducción de discos basales, se realizó el diagnóstico de virus OYDV de los 48 discos basales de los que fueron aislados los meristemas. Para todas las muestras analizadas, se presentó identificó presencia de virus OYDV. Este resultado se esperaba obtener en las muestras iniciales, debido a que posteriormente se realizó un diagnóstico fenotípico de las plantas; es decir la observación visual de la sintomatología causada por la infección de este virus. Como en estudios anteriores, realizados por Ramírez (2013) y Vega (2015), bulbos provenientes de la misma granja presentaron infección viral por OYDV, se esperaba tener esta misma incidencia en la familia A17 proveniente de la misma Granja Experimental. El 100% de infección viral de OYDV, se puede justificar, debido al método de propagación de esta variedad de Shallot en la Granja Experimental.

La propagación es de forma vegetativa, es decir se siembran bulbos como semillas. Al realizar esto, no existe un método de eliminación de virus, como ocurriría con siembra de semilla. La siembra de semilla, en países con estaciones climáticas, permite obtener material vegetal nuevo sin contaminación. Las semillas del género *Allium*, no poseen virus OYDV, pero pueden portar otros tipos de virus como Shallot Latent Virus (SLV) o variedades de Allexvirus (Davis R., Aegerter B., 2014). Como Davis y Aegerter indican, es importante el manejo y uso de semillas provenientes de bulbos libres de virus, ya que si bien el virus OYDV no se transmite a través de semillas, semillas generadas por bulbos infectados con este virus son de mala calidad. Es decir, semillas que no permiten obtener bulbos de tamaño y forma esperada, así como el tiempo de brotación (2014). Así mismo, las infecciones virales se pueden transmitir de una familia a otra por contacto de tejidos o por áfidos (BIOREBA, 2011; Hailekidan et al., 2013; Diekmann, 1997). Esto influye en la infección viral total de las variedades de Shallot en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito. Debido a que se conoce la procedencia de los bulbos y que de forma fenotípica, se ha diagnosticado el virus, se puede utilizar ELISA como método de screening general de las muestras para la confirmación de virus presentes en la muestra inicial.

8.2.1. Eficiencia del tratamiento de termoterapia para la erradicación del virus OYDV,

El tratamiento de termoterapia consistió en someter a los meristemas apicales sembrados in vitro, a 38°C durante 4 días. Se considera que este tratamiento inhibe la actividad de la retrotranscriptasa viral, evitando de esta manera la replicación y dispersión del virus en la planta regenerada a partir de meristemas, con su consecuente erradicación (Fletcher, et, al. 1998). En este estudio, el 60% (9/15) de los meristemas sometidos a termoterapia regeneraron plantas libres de virus, en tanto que el, 40% (6/15) mantenía la

infección viral al final del experimento y el 50% (15/30) o no regeneró plantas o fueron descartados por contaminación. El porcentaje de erradicación de virus es mayor al 55% de erradicación reportado por Vega (2015), pudiendo deberse principalmente a la cantidad de individuos diagnosticados en este estudio; así como la familia que se utilizó, debido a que el genotipo de las variedades influyen en la eficiencia de los tratamientos (Shibolet, 2001).

Por otro lado, este porcentaje obtenido está dentro del rango de eficiencia de erradicación de virus OYDV reportados; comparado con otros estudios que indican 50% hasta 80% de efectividad de la termoterapia para la erradicación del virus OYDV (Mahmoud, Hosseney, Mahmoud, 2009; Su Chuang y Wen-Shann, 1994; Fletcher, 1998).

Hay que anotar que en los estudios antes mencionados, los tiempos de termoterapia fueron más largos, variando entre 5 días a 1 semana o más, y el estadio de los bulbos al momento de ser sometidos al tratamiento también fue diferente (bulbos frescos o en desarrollo en otros estudios vs bulbos secos en este estudio). Estos pueden ser factores que influyen en la variación del porcentaje de erradicación de virus en estos estudios ((Mahmoud, Hosseney, Mahmoud, 2009; Su Chuang y Wen-Shann, 1994; Fletcher, 1998). Sin embargo, influencia de estas variaciones metodológicas, en los resultados, no puede ser estimada con los datos disponibles.

En otros estudios realizados en cebolla Shallot, cuando se obtuvo plantas libres de virus OYDV, a partir de termoterapia, se evidenció también la erradicación de Carnation Latent Virus (CLV) y SLV los cuales son especies de *Carlivirus*. Por otro lado, no se obtuvo la misma respuesta hacia la termoterapia con el potyvirus Garlic Yellow Streak Virus (GYSV) (Conci, Nome, 1991).

Por otro lado, se considera que la temperatura más elevada utilizada en el tratamiento de termoterapia, que la temperatura de cultivo normal, no solo afecta a los virus, sino también a los explantes, cuya sensibilidad depende del genotipo. En este caso, el 50% (15/30) de los

explanes fueron desechados por varias causas, una de las cuales podría ser el estrés generado por el tratamiento de termoterapia (Fletcher, et al., 1998); así también, la termoterapia inhibe el funcionamiento correcto de procesos enzimáticos realizados en la planta, por lo que el metabolismo de la planta disminuye (Conci, Nome, 1991). Otros factores para la reducción del porcentaje de regeneración de las plantas puede ser, una mayor tasa de deshidratación de las células, por la temperatura; así como contaminación y manejo del operador (Shiboleth, 2001).

8.2.2. Eficiencia de la quimioterapia para la erradicación de virus OYDV

El tratamiento de quimioterapia con $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ribavirina, produjo el porcentaje más alto de erradicación viral y de regeneración. Se obtuvo en este tratamiento, 43% (13/30) de plántulas descartadas por muerte o contaminación. Es importante recalcar que si bien la Ribavirina elimina el virus de la planta, puede afectar también en cierto porcentaje a la planta, dependiendo de la cantidad de Ribavirina colocada en el medio. Al ser la Ribavirina un nucleósido análogo, este puede interferir en la síntesis de proteínas de la planta al momento de ser insertado en la cadena de ARNm de la planta (Sigma- Aldrich, 2015). En cuanto a las 17 plantas diagnosticadas, se obtuvo un 100% (17/17) de erradicación del virus OYDV. Este valor de erradicación viral es diferente al obtenido por Fletcher, et al, (1998), quienes lograron 60-62% de erradicación de virus para cebolla Shallot, usando la misma concentración de Ribavirina. Esto indica un incremento en la eficiencia de la terapia para el presente ensayo con cebolla Shallot de la familia A17. Se pudo evidenciar un aumento en la eficiencia de erradicación de virus en quimioterapia 100%, con respecto al estudio realizado por Ramírez (2013), el cual obtuvo un 55% de erradicación de virus. La diferencia de eficiencia entre estos dos experimentos puede deberse al estadio en el que se realizó el tratamiento. En el caso de Ramírez, se realizó el tratamiento durante la introducción a disco

basal, mientras que el del estudio actual se realizó el tratamiento en meristemas. Lo que podría inferir en la eficiencia de eliminación (Hua G. et al., 2012).

En otros estudios se han realizado tratamientos de quimioterapia en distintas especies, a diferentes concentraciones de Ribavirina, obteniendo porcentajes de erradicación viral entre 37-100%, lo que indicaría que los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de porcentaje erradicación del virus OYDV (Neeraj, V, et al., 2005; Hua, G, et al., 2012).

8.2.3. Eficiencia de la combinación de termoterapia y quimioterapia para la erradicación de virus OYDV

Al someter los meristemas de cebolla Shallot a 38° C por 4 días, en un medio de cultivo (MS, suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5 g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹ y NAA 1,1uM + BAP 8,9uM conteniendo 25mg.L⁻¹ de Ribavirina), se obtuvo un 47% (14/30) de plantas descartadas por muerte o contaminación. De las 16 plantas diagnosticadas, el 100% (16/16), resultó negativo para presencia de virus. Esto indicaría que el porcentaje de erradicación viral fue el mismo al obtenido por quimioterapia sola, mientras que el porcentaje de plantas muertas o contaminadas fue similar al observado en termoterapia sola; similar a lo sucedido en el estudio realizado por Neeraj V, Ram R y Zaidi A (2005). En este estudio se obtuvo un porcentaje igual de supervivencia de los meristemas comparando termoterapia y terapias combinadas y de porcentajes similares de plantas libres de virus tanto en quimioterapia como en terapias combinadas. Este resultado podría indicar el beneficio de la acción combinada de las dos terapias, especialmente si se incluye en el análisis el factor económico por el costo de la Ribavirina. También estaría indicando, como se mencionó en el tratamiento de termoterapia, que la temperatura en este tratamiento, no solo estaría afectando al virus OYDV sino también a los meristemas que no se desarrollaron (Su-Chuan H, Wen-Shan L, 1994; Neeraj Verma et, al., 2005).

El porcentaje de erradicación de virus logrado en este estudio, con la acción combinada de las dos terapias, está dentro del rango observado en otros estudios, los cuales varían entre 50-100%, dependiendo del tiempo de exposición de la planta a la terapia, y de la variedad con la que se trabaja (Fletcher, 1998; Su-Chuan H, Wen-Shan L; 1994; Neeraj Verma et, al., 2005, Robledo-Paz, A y Tovar-Soto M; 2012). También se observa que, al combinar las dos terapias, el porcentaje de erradicación de virus aumentó con respecto al tratamiento de termoterapia en un 40%, y presentó el mismo porcentaje de erradicación de virus OYDV que quimioterapia.

Se ha encontrado en otros estudios, que si bien la termoterapia combinada con quimioterapia, puede disminuir el porcentaje de regeneración de plantas debido a la temperatura al que está expuesto el meristema, el porcentaje de regeneración de las mismas varía entre un 80-100%. Siendo este porcentaje mayor al obtenido en este estudio el cual fue 57%, lo que se atribuye el restante 30% principalmente a la condición de bulbos iniciales recibidos y manejo del operador (Fletcher, 1998; Su-Chuan Hsieh, Wen-Shan Lee; 1994; Neeraj Verma et, al., 2005, Robledo-Paz, A y Tovar-Soto M; 2012).

8.2.4. *Eficiencia del tratamiento control para la erradicación de virus OYDV*

En cuanto al cultivo de meristemas, sin terapia adicional el cual se consideró como control para este estudio, el porcentaje de plantas muertas o contaminadas fue de 43% (13/30). Las restantes 17 plantas fueron evaluadas para virus OYDV. De estas, se obtuvo, 53% (9/17) plantas libres de virus OYDV y 47% (8/17) plantas que mantuvieron la infección viral. Estudios de Conci y Nome (1991); y Ramírez (2013) indican porcentajes de erradicación de virus OYDV entre 17% y 20% únicamente con cultivo de meristemas, mientras que Vega (2015), reporta 37% de erradicación de virus OYDV. El 53% obtenido en este estudio muestra una diferencia de al menos 20% en la eficiencia del tratamiento con el estudio de Vega (2015) y 30% más con respecto a Ramírez (2013).

La erradicación de virus por cultivo de meristemas se produce debido a que estas estructuras carecen de tejidos vascularizados y plasmodesmos, por los que los virus se dispersan (Vieira et al., 2015). El cultivo de meristemas implica un trabajo preciso para obtener material libre de tejidos vascularizados, a la vez que el meristema esté acompañado al menos por un primordio foliar como indica el protocolo de Ramírez (2013). Por esta razón, la eficiencia de erradicación de virus OYDV, así como el porcentaje de plantas muertas con este tratamiento, varía dependiendo tanto de la habilidad del operador, como del cultivo utilizado y su genotipo, como ya ha sido descrito (Shiboleth, 2001) (Figura 5); así también como el tamaño de muestra analizado.

En otros estudios, se ha realizado eliminación de virus mediante cultivo de meristemas. El estudio de Ramírez y sus colaboradores (2006), obtiene plantas libres de especies Potyvirus, como GLV, LYSV, GLCM, SLV; en *Allium sativum*.

8.3. Determinación del mejor tratamiento para erradicación de virus OYDV en cebolla Shallot.

Como se ha descrito anteriormente, la eficiencia de erradicación viral varía dependiendo del genotipo con el que se trabaje (Shiboleth, 2001). Para esta variedad de cebolla Shallot, proveniente de la Granja de la Universidad San Francisco de Quito (familia A17) se determinó que los tratamientos más eficientes para la erradicación de virus OYDV fueron quimioterapia (50mg.L⁻¹ de Ribavirina) y terapias combinadas (38°C por 4 días y 25mg.L⁻¹ de Ribavirina), con 100% de erradicación para los dos; adicionalmente, con el tratamiento de quimioterapia se obtuvo la mayor supervivencia de plántulas. Para el análisis económico de los dos tratamientos, se consideró el costo de la Ribavirina. Actualmente, la botella de 50mg del antiviral Ribavirina (Sigma Aldrich) tiene un valor de 163.5 USD (Sigma-Aldrich, 2015). Para el tratamiento de terapias combinadas, se utilizó 12,5mg de antiviral, con un valor

económico del tratamiento de 40,88USD. Por otro lado, el valor del tratamiento de quimioterapia para el cual se utilizó 25mg, fue de 81,75 USD, es decir el doble de terapias combinadas. Por esta razón, se recomienda utilizar la termoterapia más quimioterapia con la mitad de Ribavirina , como alternativa para la erradicación de virus. Este ahorro a nivel de granja puede ser significativo.

Luego de determinar la eficiencia y costo de los dos tratamientos más eficientes, se decidió realizar una comparación de eficiencia entre termoterapia y control. El tratamiento de termoterapia tuvo un 60% de eficiencia de erradicación de virus OYDV, mientras que el de control fue de 53%. Debido al poco porcentaje de diferencia entre estos tratamientos, se decidió realizar una prueba de significancia. Para esto, se utilizó la prueba U de Man-Whitney la cual es una prueba cualitativa y no paramétrica. Se decidió utilizar esto, ya que los datos obtenidos para analizar de la erradicación viral se basan en presencia o ausencia de virus; es decir de datos no cuantitativos o numéricos. Una vez realizado la prueba U, se obtuvo un $P=0,69$; según la prueba “U” de Mann-Whitney define si $P>0,05$ no existe diferencias significativas. Por esta razón, en este estudio, la termoterapia no fue eficiente como se esperaba.

8.4. Análisis económico para la detección de virus OYDV.

Como optimización del protocolo de eliminación de virus, se decidió realizar también un análisis económico de los métodos de detección para el virus OYDV. Como mencionado en este texto, los métodos moleculares utilizados para la detección de virus OYDV pueden ser tanto ELISA como RT-PCR. Para esta comparación se tomaron en cuenta valores económicos de un kit para ELISA y un kit de RT-PCR teniendo como referencia de fabricante para los dos a Thermo Fischer Scientific Inc. (Invitrogen). Para los dos análisis se asumió que los kits tanto de Elisa como de RT-PCR ya contenían los anticuerpos para ELISA y primers

para RT-PCR específicos para OYDV, ya que el costo de síntesis de los mismos va a variar dependiendo de la complejidad del diseño del mismo. Se obtuvo que el costo por reacción de ELISA es de 6,25 USD, mientras que el costo de RT-PCR fue de 4,44USD. Siendo más económico el uso de RT-PCR como método de diagnóstico. Los valores de los dos kits, se obtuvieron de valores aproximados estimados por la casa comercial (Thermo Fisher Scientific, 2016).

9. Conclusiones

Se logró optimizar el protocolo de erradicación del virus OYDV incluyendo la Ribavirina en el medio de regeneración (MS, suplementado con sacarosa 30 g.L^{-1} , benomyl 1.5 g.L^{-1} , agar 7 g.L^{-1} y NAA $1,1 \mu\text{M}$ + BAP $8,9 \mu\text{M}$), ya sea sola o combinada con termoterapia.

Se determinó que la quimioterapia y terapias combinadas son los métodos más eficientes con 100% de erradicación de virus OYDV.

En términos de costo, las terapias combinadas es el tratamiento más económico comparado con quimioterapia, ya que esta requiere la mitad de concentración de Ribavirina (25 mg. L^{-1}), que en quimioterapia (50 mg. L^{-1} de Ribavirina), teniendo el mismo porcentaje de erradicación de virus OYDV.

El tratamiento de termoterapia, si bien contribuye a la limpieza de virus, también afecta al desarrollo de los meristemas.

10. Recomendaciones

- Determinar eficiencia de Ribavirina 25mg.L^{-1} con el objetivo de reducir costos.
- Utilizar el protocolo de quimioterapia o terapias combinadas para la erradicación del virus OYDV en plantas de cebolla Shallot de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.
- Utilizar material vegetal inicial óptimo para el desarrollo eficaz del ensayo.
- Verificar resultados obtenidos en este estudio, incrementando el número de meristemas por tratamiento con el objetivo de lograr un mayor soporte estadístico.
- Utilizar Nested PCR en las bandas amplificadas para una mejor detección del virus en el gel de electroforesis.
- En caso de querer realizar screening general de las muestras con ELISA, determinar costo de síntesis de anticuerpos específicos para OYDV y costo de síntesis de primers.

11. Referencias bibliográficas

- Abd Serotec. (2016). An introduction to ELISA. A Bio-Rad Company. Extraído de internet desde : <https://www.abdserotec.com/an-introduction-to-elisa.html>
- Benkeblia, N., (2004) Antimicrobial activity of essential oils of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). LWT- Food Science and Technology. V. 37. Issue 2. Pp 263-268
- BIOREBA. (2011) Onion Yellow Dwarf Virus. DAS-ELISA. Versión 2. Suiza. Extraído desde:
http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/OYDV_DAS_ELISA.pdf
- Bufler, G. (2009) Exogenous ethylene inhibits sprout growth in onion bulbs. Annals of Botany, 103.23-28.
- Conci, V. Nome, S. (1991) Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. Journal of Phytopathology. 132: 186-192
- Conexiones USFQ. (2015). Al rescate de la cebolla paiteña, baluarte de la gastronomía ecuatoriana. Universidad San Francisco de Quito. Video- Documental. Obtenido de internet desde: <http://conexiones.usfq.edu.ec/index.php/346-al-rescate-de-la-cebolla-paitena-baluarte-de-la-gastronomia-ecuatoriana>
- Currah, L. Proctor, F. (1990) *Onions in Tropical Regions*. Bulletin 35, Interview. Natural Resources Institute, Chatham Maritime, Kent, UK 232. Extraído de internet desde: [https://c.ymcdn.com/sites/echocommunity.site-ym.com/resource/collection/E66CDFDB-0A0D-4DDE-8AB1-74D9D8C3EDD4/Onions_in_the_Tropics_&_Subtropics_\[web_format\].pdf](https://c.ymcdn.com/sites/echocommunity.site-ym.com/resource/collection/E66CDFDB-0A0D-4DDE-8AB1-74D9D8C3EDD4/Onions_in_the_Tropics_&_Subtropics_[web_format].pdf)

- Davis R., Aegerter B.(2014). Onion Yellow Dwarf Virus. UC IPM Pest Management Guidelines: Onion and Garlic. UC ANR Publication 3453. Obtenido de internet desde: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/selectnewpest.onion-and-garlic.html>
- Diekmann, M. Ed. (1997) *Allium spp.* FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 18.
- EPPO (2001) *Allium crops*. Guidelines on good plant protection practice. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Boletín 31. 211-230
- Fletcher, P. Fletcher, J. (1998) Lewthwaite, S. *In vitro elimination of onion yellow dwarf and Shallot latent viruses in Shallots (Allium cepa var. ascalonicum L.)*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 26: 23-26.
- Hailekidan B., Andargie M., Assefa K. (2013). In vitro Plantlet regeneration from the Bulbus of Shallot (*Allium Cepa* var. group *Aggregatum*). Research in plant sciences. Vol 1. 45-52
- Herischwgger P. Jakse J. Trontelj P. Bohanec B. (2010) Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae), Molecular Phylogenetics and Evolution, Volume 54, Issue 2, Páginas 488-497, ISSN 1055-7903
- Hua G, N. Honga,b, L.P. Wanga, H.J. Huc, G.P. Wang, (2012). Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. Crop Protection. V 37. Pp 20-25
- INEC. (2012) *Boletín Agropecuario Mensual Diciembre 2012*. Ecuador en Cifras. Extraído de internet desde: <<http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/pdfs/boletinag05.pdf>>
- Kahane, R. Rancillac, M. Teyssendier de la Serve, B. (1991) *Long-term multiplication of onion (Allium cepa L.) by cyclic shoot regeneration in vitro*. Plant Cell and Organ Culture, Vol. 28: France. 281-288.

- MAGAP. (2012) *Allium cepa Distribución de Siembras y Cosecha Censo 2012*.
- Mahmoud, S. Maaty, S. Abdel-Ghaffar, M. (2007) *Identification of Onion Yellow Dwarf Potyvirus as one of the Major Viruses Infecting Garlic in Egypt*, American Eurasian Journal of Agriculture and Environment, Vol. 6: 746-755.
- Mahmoud S., Hosseney M., Mahdoudh A. (2009). Evaluation of some therapies to eliminate potato Y Potyvirus from potato plants. International journal of virology. ISSN 1816-4900.
- Majumder, S. Baranwal, V. Joshi, S. (2008) *Simultaneous Detection of Onion Yellow Dwarf Virus and Shallot Latent Virus in infected leaves and cloves of Garlic by Duplex RT-PCR*. India, Journal of Plant Pathology, Vol. 90, 371-374.
- Neeraj Verma, Raja Ram, A.A. Zaidi, (2005). In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. V 103. Issue 2. Pp239-247
- Ramírez, D (2013) Regeneración de plántulas de chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) libres de los virus Latente del Chalote y del Enanismo Amarillo de la cebolla por medio de cultivo de meristema apical y quimioterapia. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito.
- Ramírez-Malagon, R., Pérez-Moreno, L., Borodanenko, A., Salinas-González, S., & Ochoa-Alejo, N. (2006). Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86, 103-110.
- Rivlin R.S. (2001). Historical perspective on the use of garlic. *Journal of Nutrition*, 131 (2001), pp. 951S–954S

- Robledo-Paz, A y Tovar-Soto M, (2012). Biotechnological Tools for Garlic Propagation and Improvement, Innovations in Biotechnology, Dr. Eddy C. Agbo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0096-6, InTech, DOI: 10.5772/30636.
- Santas J., Almajano M., Carbó R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. International Journal of Food, Science and Technology. 45, 403-409.
- Saos F., Hourmant A., Esnault F., Chauvin E. (2002). In vitro Bulb development in Shallot (*Allium cepa* L. *Aggregatum* Group): Effects of anti-gibberellins, sucrose and light. Annals of Botany 89: 419-425.
- Shahraeen N., Lesemann L., Ghtbi T. (2008) Survey for viruses infectiong onion, garlik and leek for identification and classification of potyvirus group. J Virol., 69: 2703-2710
- Sharma S. (2015) Health benefits of onion (A-review). International journal of scientific research. Vol 4, issue 6
- Sigma Aldrich (2015). Ribavirin. Product Catalog. Extraído de internet desde: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r9644?lang=fr®ion=CA>
- SINAGAP (Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca) (2013). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. Extraído de internet desde: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/>
- Sinclair, P. (1988). The botany of onions. Australian Onion Grower. Vol. 5. Pp 9.
- Shiboleth, Y., Gal-On, A., Koch, M., Rabinowitch, H., & Shahraeen et al., 2008, R. (2001).Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. Annals of Applied Biology, 138, 187-195.

- Soliman A., Mahmoud S., Dawood R. (2012). Molecular characterization of Onion Yellow Dwarf Virus (Garlic Isolate) with Production of virus-free plantlets. *International journal of virology*. Vol 8. 61-70
- Su-Chuan, H. Wen-Shann, L. (1994) Studies on the virus-elimination techniques of green onion 'Lan Yang No. 1' and 'Tao Yuan No. 3'. National Digital Library of theses and dissertations in Taiwan.
- Taskin H., Baktemur G., Kurul M., Buyukalaca S. (2013). Use of Culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real time PCR. *The Scientific World Journal*. Volume 2013.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Find ELISA Kits by Target. Invitrogen. Extraído desde internet desde: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/elisa/elisa-kits/target-specific-elisa-kits.html>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Reverse Transcription. Invitrogen. Extraído desde internet desde: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription.html.html?icid=fr-ssiii-main>
- Thorpe T ,Vasil I., (1994). *Plant cell and Tissue culture*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Pp 37-70
- Vega, J. (2015). Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla chalote (*Allium cepa var. aggregatum*) a partir de meristema apical para obtener plantas libres de virus. Tesis de grado. Laboratorio de biotecnología de plantas. Universidad San Francisco de Quito.
- Vieira R., Lima da Silva A., Zaffari G., Steinmacher D., Pachecho H., Guerra M. (2015). Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum L.*) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiologiae Plantarum*.37:1733

12. TABLAS

Tabla 1 Datos generales de material vegetal. Recuento del material vegetal inicial disponible y evolución durante el cultivo in vitro. Viables corresponde a material vegetal óptimo para el uso. Contaminados, se refiere a material vegetal contaminado por hongo y/o levadura. Muertos corresponde a material vegetal sin desarrollo evidente o muerto.

Datos generales				
Bulbos secos	Viables	Contaminados	Muertos	Total
bulbos fríos (a partir de bulbos secos viables)	95	5		100
discos basales a partir de bulbos fríos viables	65	30		95
discos basales para meristemas	117			117
Meristemas (a partir de discos basales viables)	48	69		117
Meristemas	120			120

Tabla 2 Registro de meristemas. Detalle La tabla muestra detalle de meristemas obtenidos por terapia; luego de los tratamientos, los meristemas que regeneraron fueron considerados como viables y los muertos o contaminados como no viables.

MERISTEMAS			
	Meristemas iniciales	Meristemas viables	Meristemas no viables
Termoterapia	30	15	15
Quimio terapia	30	22	8
Terapias combinadas	30	23	7
Control	30	20	10
Total	120	80	40

Tabla 3 Meristemas diagnosticados. Número de plantas viables; es decir regeneradas después del tratamiento, número de plántulas evaluadas para presencia de virus OYDV luego de los tratamientos. Las plantas no diagnosticadas, corresponden a plantas que luego del tiempo de tratamientos no regeneraron o se murieron.

TABLA DE REGISTRO MERISTEMAS			
	Meristemas viables	Plantas diagnosticadas	Plantas no diagnosticadas
Termoterapia	15	15	0
Quimio terapia	22	17	5
Terapias combinadas	23	16	7
Control	20	17	3
Total	80	65	15

Tabla 4 Registro de meristemas para la aclimatación. Plantas en invernadero luego de proceso de aclimatación a partir de meristemas que regeneraron luego de los tratamientos. Las plantas que no fueron aclimatadas y llevadas al invernadero, murieron luego que material vegetal fue tomado de estas para realizar extracción de ARN para determinar erradicación de virus OYDV.

TABLA DE REGISTRO MERISTEMAS		
	Meristemas viables	Invernadero
Termoterapia	15	4
Quimio terapia	22	10
Terapias combinadas	23	7
Control	20	5
Total	80	26

Tabla 5 Porcentaje de eliminación de virus OYDV. Resumen de porcentaje de erradicación de virus y plantas descartadas para cada terapia. Plantas descartadas se refiere a plantasmuertas o contaminadas.

% ELIMINACIÓN DE VIRUS OYDV				
TRATAMIENTO	Plantas iniciales	Plantas descartadas	Plantas diagnosticadas	
	Con virus		Con virus	Sin virus
Termoterapia	100	50	40	60
Quimioterapia	100	43	0	100
Terapias combinadas	100	47	0	100
Control	100	43	47	53

13. FIGURAS

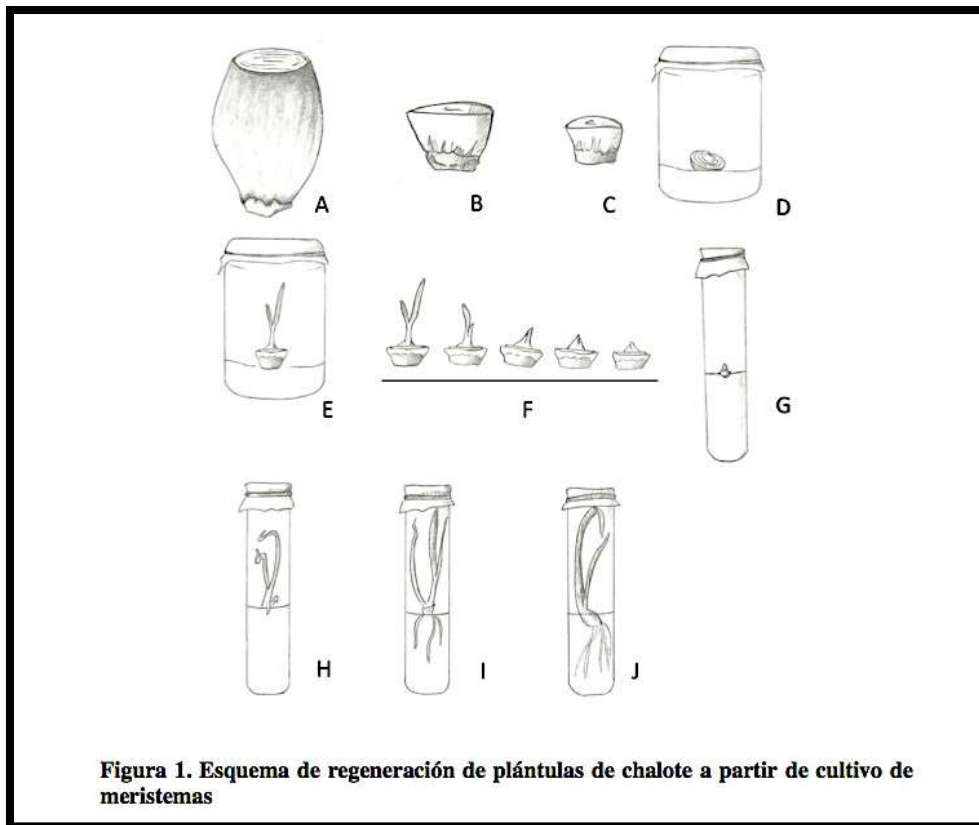


Figura 1 Diagrama de extracción de meristema. A) bulbo lavado B) Disco basal desinfectado. C) Disco basal cortado de 5-7mm de alto. D) Introducción in-vitro de disco basal. E) Disco basal luego de 1 semana, con hojas viables para extracción de ARN. F) Aislamiento de meristemas. G) Tratamiento. C) Desarrollo de la planta en tratamiento I,J) Desarrollo de raíces de meristemas. Tomado de Darío Ramírez (2013).

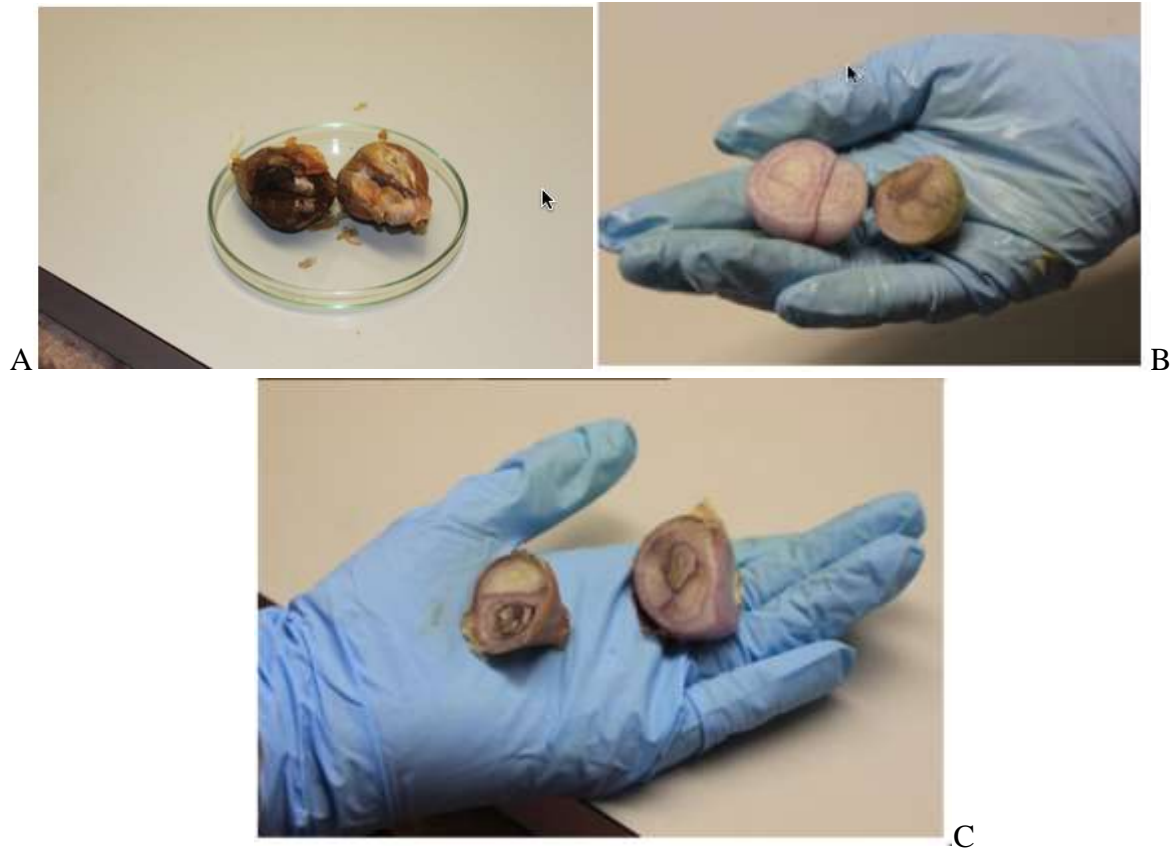


Figura 2 Bulbos recibidos. Bulbos de mala calidad (podridos) identificados en el material inicial. A) Antes del tratamiento en frío B) Después del tratamiento en frío. C) Contaminación dentro de disco basal.

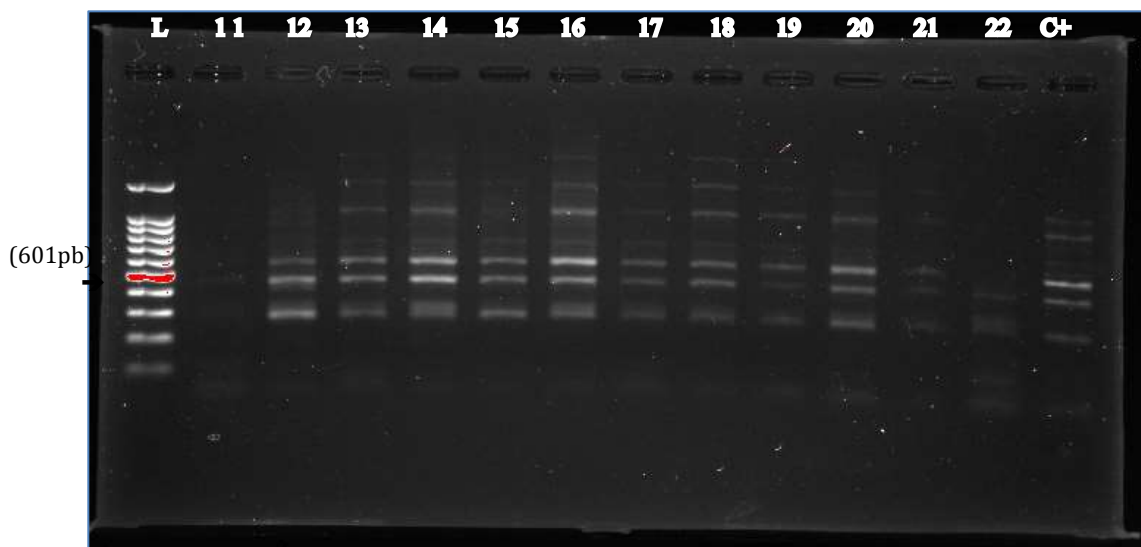


Figura 2 Gel de agarosa. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación PCR en muestras de cebolla Shallot con infección viral. Ladder 100pb (Invitrogen), 11-12 muestras de cebolla evaluadas, C+: control positivo. Presencia de banda de 601pb es evidencia de infección viral ((Mahmoud, et al. 2007).

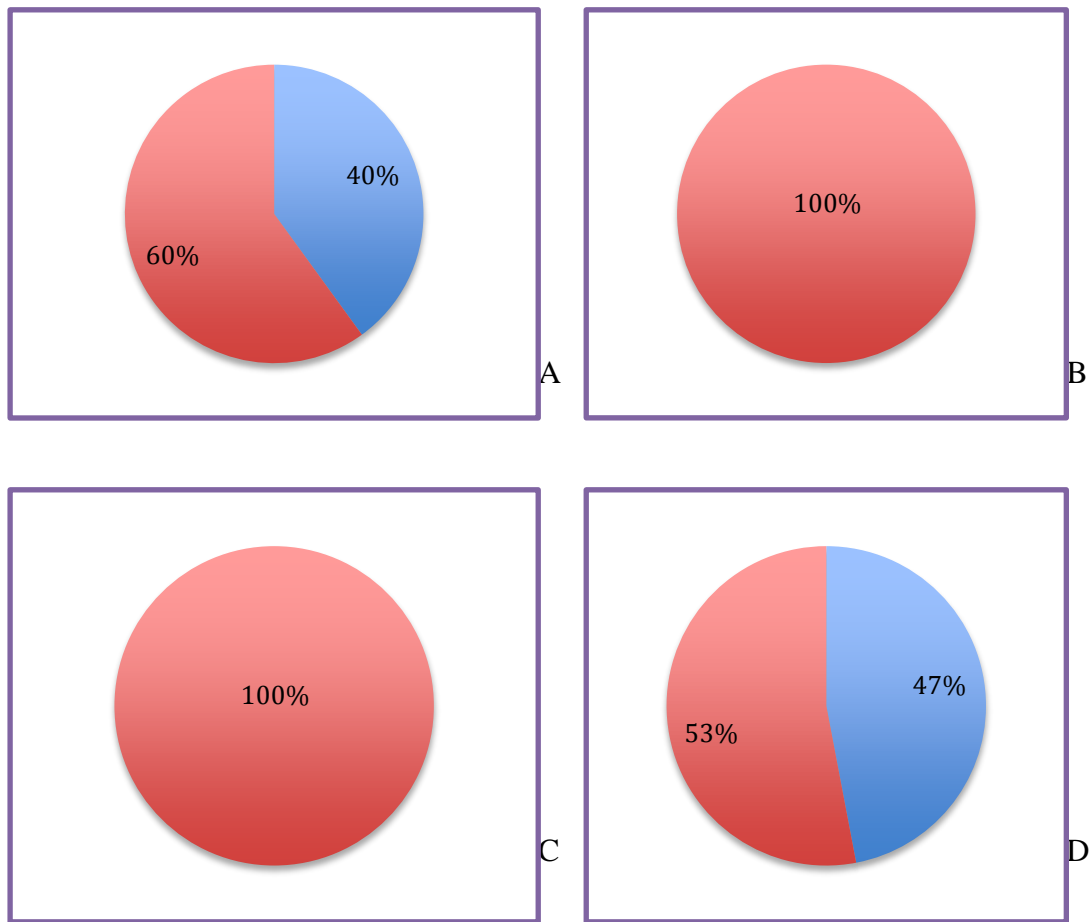


Figura 3 Porcentaje de eficiencia de terapias. Porcentajes erradicación de virus OYDV y porcentaje de plantas con virus OYDV. Plantas diagnosticadas libres de virus OYDV después del tratamiento (rojo). Plantas diagnosticadas con virus OYDV después del tratamiento (azul). Eficiencia de A) Termoterapia. B) Quimioterapia. C) Terapias combinadas. D) Control.

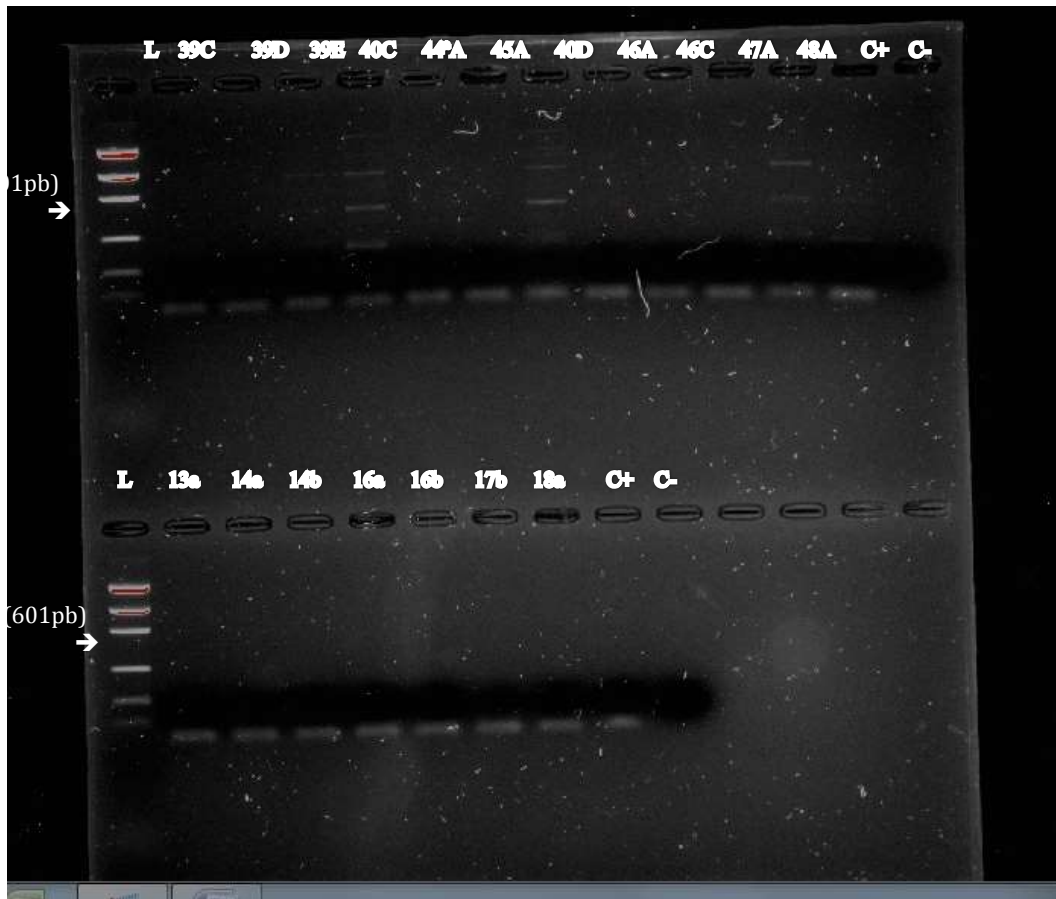


Figura 4 Gel de agarosa muestras. Control y terapias combinadas. Gel de agarosa 1,5%. Primera fila correspondiente a muestras control, segunda fila correspondiente a muestras de terapias combinadas; es decir termoterapia (38°C por 4 días) combinada con quimioterapia (25 mg.L⁻¹ de Ribavirina). L: Ladder 100pb (Invitrogen). Muestras 39C-48A, individuos evaluados de tratamiento Control. Muestras 13A- 18A, individuos evaluados de Terapias combinadas. La banda de 601pb muestra presencia de virus OYDV.

ANEXOS

Anexo 1 Detalle de los meristemas apicales de cebolla Shallot. Meristemas sometidos a termoterapia, quimioterapia y combinación de las dos. Los datos muestran el número de discos basales por terapia (amarillo), así como meristemas extraídos por discos basales (azul) y la codificación de los meristemas (blanco). Los números con letra muestra la codificación de los meristemas extraídos. El número indica el número del disco basal del que fue extraído, mientras que la letra muestra la repetición o número de meristema extraído por disco basal. Por ejemplo el código 9b indica que el meristema provino del disco basal 9 y fue el segundo meristema extraído de este disco basal . A) Termoterapia y terapias Combinadas. B) Quimioterapia y control

		MERISTEMAS INICIALES EXTRAÍDOS (POR TERAPIAS)																								
TRATAMIENTOS		TERMOTERAPIA												TERMOTERAPIA + QUIMIOTERAPIA												
MUESTRAS PARA ENSAYO TOTALES	discos basales	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	meristemas obtenidos	3	4	2	1	2	4	3	1	2	3	2	3	2	3	1	4	2	2	2	5	3	2	2	2	
		1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	11a	12a	13a	14a	15a	16a	17a	18a	19a	20a	21a	22a	23a	24a	
		1b	2b	3b		5b	6b	7b		9b	10b	11b	12b	13b	14b		16b	17b	18b	19b	20b	21b	22b	23b	24b	
		1c	2c			6c	7c				10c		12c		14c		16c				20c	21c				
			2d				6d											16d				20d				
																							20e			
		TOTAL MERISTEMAS	30												30											

A

		MERISTEMAS INICIALES EXTRAÍDOS (POR TERAPIAS)																							
TRATAMIENTOS		QUIMIOTERAPIA												CONTROL											
MUESTRAS PARA ENSAYO TOTALES	discos basales	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	meristemas obtenidos	1	3	2	3	3	2	4	2	1	2	1	3	3	3	5	4	2	2	2	2	2	3	3	2
		25a	26a	27a	28a	29a	30a	31a	32a	33a	34a	35a	36a	37a	38a	39a	40a	41a	42a	43a	44a	45a	46a	47a	48a
			26b	27b	28b	29b	30b	31b	32b		34b		36b	37b	38b	39b	40b	41b	42b	43b	44b	45b	46b	47b	48b
			26c		28c	29c		31c					36c	37c	38c	39c	40c						46c	47c	
								31d									39d	40d							
																	39e								
		TOTAL MERISTEMAS													30										

B

Anexo 2 Concentración de ARN extraído. Concentración de ARN en ng/uL de material vegetal de muestras iniciales de cebolla Shallot del disco basal 1-48

# MUESTRA	Nucleic Acid Conc (ng/uL)	# MUESTRA	Nucleic Acid Conc (ng/uL)
1	2821,2	25	1024,8
2	703,9	26	1818,5
3	2250,3	27	776,4
4	3432,4	28	1156,7
5	1901,1	29	905,9
6	541,3	30	1594,2
7	1736,8	31	1807
8	2531,1	32	1256,8
9	1004,5	33	1772,1
10	2283,1	34	2082,3
11	1937,7	35	1851,3
12	3137,3	36	1897,7
13	2092,6	37	1464,7
14	692,6	38	630,1
15	2091,5	39	1829,6
16	35,1	40	1604,6
17	1404,8	41	1091,5
18	302,9	42	977,7
19	1393,7	43	2645
20	2181,5	44	1058,5
21	1701,6	45	813,9
22	1502,1	46	1277,9
23	1319,4	47	567
24	2459,5	48	692,3

Anexo 3 Registro de meristemas en tratamiento por termoterapia. Números seguidos de letras indica codificación de meristemas. El número indica el disco basal de donde provino el meristema y la letra indica el número por repetición por meristema. Plantas diagnosticadas antes del tratamiento, corresponde a muestras iniciales obtenidas de 48 discos basales introducidos. Plantas descartadas corresponde a plantas muertas o contaminadas. Plantas diagnosticadas corresponde a plantas que fueron aptas para análisis de erradicación del virus. Letra X señala el estado de cada muestra. La tabla muestra 100% de plantas iniciales con virus. 50% de plantas descartadas. 20% de plantas diagnosticadas con virus y 30% de plantas diagnosticadas sin virus

TRATAMIENTO POR TERMOTERAPIA				
MUESTRA	Plantas diagnosticadas (antes de tratamiento)	Plantas descartadas	Plantas diagnosticadas(después del tratamiento)	
	Con virus		Con virus	Sin virus
1a	x			x
1b	x	x		
1c	x	x		
2a	x		x	
2b	x	x		
2c	x	x		
2d	x		x	
3a	x			x
3b	x			x
4a	x			x
5a	x	x		
5b	x	x		
6a	x		x	
6b	x			x
6c	x	x		
6d	x			x
7a	x		x	
7b	x		x	
7c	x			x
8a	x			x
9a	x		x	
9b	x	x		
10a	x	x		
10b	x	x		
10c	x	x		
11a	x			x
11b	x	x		
12a	x	x		
12b	x	x		
12c	x	x		
TOTAL	30	15	6	9
%	100%	50	20	30

Anexo 4 Registro de meristemas por terapias combinadas. Números seguidos de letras indica codificación de meristemas. El número indica el disco basal de donde provino el meristema y la letra indica el número por repetición por meristema. Plantas diagnosticadas antes del tratamiento, corresponde a muestras iniciales obtenidas de 48 discos basales introducidos. Plantas descartadas corresponde a plantas muertas o contaminadas. Plantas diagnosticadas corresponde a plantas que fueron aptas para análisis de erradicación del virus. Letra X señala el estado de cada muestra.

TRATAMIENTO POR TERMOTERAPIA + QUIMIOTERAPIA				
MUESTRA	Plantas diagnosticadas (antes de tratamiento)	Plantas descartadas	Plantas diagnosticadas (después del tratamiento)	
	Con virus		Con virus	Sin virus
13a	x			x
13b	x	x		
14a	x			x
14b	x			x
14c	x	x		
15a	x			x
16a	x			x
16b	x			x
16c	x			x
16d	x			x
17a	x			x
17b	x			x
18a	x			x
18b	x			x
19a	x	x		
19b	x	x		
20a	x	x		
20b	x	x		
20c	x			x
20d	x			x
20e	x			x
21a	x	x		
21b	x	x		
21c	x	x		
22a	x	x		
22b	x	x		
23a	x	x		
23b	x	x		
24a	x	x		
24b	x			x
TOTAL	30	14	0	16
%	100	47	0	53

Anexo 5 Registro de meristemas en tratamiento por quimioterapia. Números seguidos de letras indica codificación de meristemas. El número indica el disco basal de donde provino el meristema y la letra indica el número por repetición por meristema. Plantas diagnosticadas antes del tratamiento, corresponde a muestras iniciales obtenidas de 48 discos basales introducidos. Plantas descartadas corresponde a plantas muertas o contaminadas. Plantas diagnosticadas corresponde a plantas que fueron aptas para análisis de erradicación del virus. Letra X señala el estado de cada muestra.

TRATAMIENTO POR QUIMIOTERAPIA				
MUESTRA	Plantas diagnosticadas (antes de tratamiento)	Plantas descartadas	Plantas diagnosticadas (después del tratamiento)	
	Con virus		Con virus	Sin virus
25a	X			X
26a	X	X		
26b	X			X
26c	X			X
27a	X			X
27b	X			X
28a	X	X		
28b	X			X
28c	X			X
29a	X			X
29b	X	X		
29c	X			X
30a	X			X
30b	X			X
31a	X			X
31b	X			X
31c	X	X		
31d	X			X
32a	X	X		
32b	X	X		
33a	X	X		
34a	X	X		
34b	X	X		
35a	X	X		
36a	X	X		
36b	X	X		
36c	X			X
37a	X	X		
37b	X			X
37c	X			X
TOTAL	30	13	0	17
%	100	43	0,00	57

Anexo 6 Registro de meristemas apicales (control). Meristemas apicales sin tratamiento o control. Números seguidos de letras indica codificación de meristemas. El número indica el disco basal de donde provino el meristema y la letra indica el número por repetición por meristema. Plantas diagnosticadas antes del tratamiento, corresponde a muestras iniciales obtenidas de 48 discos basales introducidos. Plantas descartadas corresponde a plantas muertas o contaminadas. Plantas diagnosticadas corresponde a plantas que fueron aptas para análisis de erradicación del virus. Letra X señala el estado de cada muestra.

CONTROL				
MUESTRA	Plantas diagnosticadas (antes de tratamiento)	Plantas descartadas	Plantas diagnosticadas (después del tratamiento)	
	Con virus		Con virus	Sin virus
38a	x	x		
38b	x	x		
38c	x	x		
39a	x		x	
39b	x		x	
39c	x			x
39d	x			x
39e	x		x	
40a	x	x		
40b	x			x
40c	x	x		
40d	x		x	
41a	x	x		
41b	x		x	
42a	x	x		
42b	x		x	
43a	x	x		
43b	x	x		
44a	x			x
44b	x	x		
45a	x			x
45b	x		x	
46a	x			x
46b	x	x		
46c	x			x
47a	x			x
47b	x			x
47c	x	x		
48a	x		x	
48b	x	x		
TOTAL	30	13	8	9
%	100	43	27	30