

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla
chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a partir de meristema
apical para obtener plantas libres de virus**

Joely Steffany Vega Aumala

Venancio Arahana, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, Enero 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales****HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a partir de meristema apical para obtener plantas libres de virus

Joely Steffany Vega Aumala

Venancio Arahana, Ph.D.

Director y Miembro del Comité

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité

Carlos Ruales, MSc.

Miembro del Comité

Stella de la Torre, Ph. D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, Enero del 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma: _____

Nombre: Joely Steffany Vega Aumala

C. I.: 1716115934

Lugar: Quito-Ecuador

Fecha: Enero de 2015

Dedicatoria

Este trabajo dedico a mi compañero de vida, mi amigo incondicional, mi crítico más sincero, mi hermano Jonathan. Gracias por demostrarme que una mirada o una sonrisa puede decir más que mil palabras, que la confianza no se regala a cualquiera y que caminar cogidos de la mano es siempre mejor.

Siempre juntos!

Agradecimientos

Este trabajo es el fruto de un gran esfuerzo compartido que no se hubiera convertido en lo que es sin el apoyo de personas que forman parte fundamental de mi vida.

Gracias a mi papá por confiar en mí y enseñarme a luchar por mis objetivos. A mi mamá por su amor infinito y apoyo incondicional. A mis hermanos: Jonathan, Normy, David y Jacob por su cariño sincero y ser mi mayor orgullo.

A toda mi gran familia, en especial a mi abuelita, a Jovy y Edwin, a mis tías, a mi prima Andre y a José Antonio. Gracias por su amor, amistad, confianza y palabras de aliento. Son el mejor equipo de vida que podría tener.

A mis profesores, María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por darle dirección y seguimiento diario a este trabajo, por todas sus valiosas enseñanzas y apoyo constante desde el primer día de mi vida universitaria. A Carlos Ruales por su gran ayuda y soporte que me permitió culminar con éxito este proyecto. A Carlos Valle por su guía en el análisis estadístico de los resultados.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal, gracias por acogerme y permitirme ser parte de un grupo excelente. A Darío Ramírez por darme la posta en este proyecto y creer en mí. A Vivi, Bernard, Meche, Estefy, Cris, Jenny, Stefy, Juan, Jo, Vero, Cami y Marce, por todas esas anécdotas, estrés, lágrimas, risas y abrazos compartidos. Espero sigamos manteniendo esta linda amistad.

A todos quienes han sido parte, infinitas gracias.

Resumen

La cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) forma varios bulbos a partir de un solo disco basal y tiene mayor contenido de sólidos que aumentan su valor gastronómico y nutracéutico. Este cultivo es afectado por varios patógenos, incluyendo virus. El virus del enanismo amarillo (OYDV) es el principal patógeno viral, que reduce la producción de este cultivo hasta en un 60%. Es importante contar con material libre de virus para su cultivo debido a que esta cebolla se propaga vegetativamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de regeneración in vitro de plantas de chalote a partir de meristemas apicales. Se aisló meristemas apicales de bulbos de chalote, se probó varios medios para la regeneración de plantas y la formación de bulbos, y se aclimató las plantas obtenidas. El porcentaje de regeneración más alto (68%) se obtuvo con el medio: MS + sacarosa 30g.L⁻¹, benomyl 1.5g.L⁻¹ + agar 7g.L⁻¹ + 1.1uM NAA + 8.9uM BAP, y de embulbamiento (76%) con el medio: MS + 10uM ancymidol + agar 7g.L⁻¹ + 50g.L⁻¹ sacarosa. Para la limpieza de virus, adicional al cultivo in vitro de meristemas apicales se evaluó el efecto de la termoterapia (4 días a 35°C), cuya eficiencia se determinó mediante RT-PCR con primers específicos para OYDV. Por medio del cultivo de meristemas apicales se obtuvo un 37% de eficiencia en la eliminación viral y en combinación con termoterapia se obtuvo un 55%. El protocolo establecido en esta investigación puede ser utilizado para mejorar la producción de bulbo-semilla libre de virus y así promover el cultivo de cebolla chalote en el país.

Abstract

Shallots (*Allium cepa* var. *aggregatum*) form clusters of bulbs from a single basal plate and have high solid content that increase their gastronomic and nutraceutical value. This crop is affected by numerous pathogens, including viral infections. OYDV (Onion Yellow Dwarf Virus) is the most important viral pathogen affecting shallots, accounting for more than 60% of yield reduction in the crop. Virus-free material is required because this onion is only propagated vegetatively. Therefore, the aim of this study was to establish an apical bud in vitro culture protocol for shallot regeneration. Apical bud was isolated and cultured in different regeneration and bulb formation media, and plants obtained were acclimatized. The best results for regeneration (68%) were observed with MS + sucrose 30g.L⁻¹, benomyl 1.5g.L⁻¹ + agar 7g.L⁻¹ + 1.1µM NAA + 8.9µM BAP and bulb formation (76%) with MS + 10µM ancymidol + agar 7g.L⁻¹ + 50g.L⁻¹ sucrose. To determine the success of producing virus free plants, thermotherapy (4 days at 35°C) was tested in addition to the in vitro culture of apical bud. The detection was carried out using RT-PCR with OYDV specific primers. We achieved 37% of virus eradication by apical bud culture and this efficiency was raised to 55% when combined with thermotherapy. The protocol established in this research can be used to improve the production of virus free bulb-seeds, and thus promote the production of shallot onions in the country.

Índice de contenido

1. Introducción	13
1.1. <i>Allium cepa</i>	13
1.2. <i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>	14
1.3. Problemas en el cultivo de cebolla chalote	17
1.3.1. Infecciones virales.....	17
1.3.1.1. Virus del enanismo amarillo – Onion yellow dwarf virus (OYDV)	18
1.4. Métodos de detección de virus en plantas	21
1.5. Métodos de erradicación de virus en plantas	23
2. Objetivo.....	27
2.1. Objetivo general.....	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Área de estudio.....	28
4. Justificación.....	29
5. Materiales	32
5.1. Colección del material vegetal y ruptura de dormancia.....	32
5.2. Introducción in vitro de chalote	32
5.2.1. Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote	32
5.3. Cultivo in vitro de meristemas apicales de chalote	32
5.4. Termoterapia	33
5.5. Aclimatación de plantas de chalote.....	33
5.6. Identificación de OYDV	33
5.6.1. Extracción de ARN total	33
5.6.2. Cuantificación de ARN total y visualización en gel de agarosa.....	34
5.6.3. Síntesis de la primera hebra de ADNc viral por transcripción inversa	34
5.6.4. Amplificación de ADN viral mediante PCR	35
5.6.5. Electroforesis en gel de agarosa	35
6. Métodos.....	36
6.1. Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales	36
6.1.1. Colección del material vegetal.....	36
6.1.2. Introducción in vitro de chalote	36

6.1.2.1.	Ruptura de dormancia mediante dos tiempos de frío	36
6.1.3.	Desinfección e introducción de discos basales de chalote a medio de inducción 37	
6.1.4.	Aislamiento y cultivo de meristemas apicales de chalote	37
6.1.5.	Enraizamiento y generación de bulbos de plántulas de chalote.	38
6.1.6.	Aclimatación de plantas de chalote	38
6.2.	Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV	39
6.2.1.	Identificación de OYDV en plantas de chalote obtenidos del campo para este estudio	39
6.2.1.1.	Extracción de ARN total de hojas de chalote	39
6.2.1.2.	Síntesis de la primera hebra de ADNc viral	40
6.2.1.3.	Amplificación y visualización de bandas de ADN complementario.....	40
6.2.2.	Cultivo in vitro de meristemas apicales de chalote y termoterapia.....	41
6.2.3.	Detección viral en plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales y termoterapia.	41
7.	Resultados	42
7.1.	Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales	42
7.1.1.	Ruptura de dormancia de meristemas apicales de chalote, aislamiento de meristemas apicales y regeneración de plantas de chalote.	42
7.1.2.	Enraizamiento y generación de bulbos de plántulas de chalote.	43
7.1.3.	Aclimatación de plantas de chalote	44
7.2.	Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV	45
7.2.1.	Identificación de OYDV en plantas de chalote previo a la limpieza de virus ...	45
7.2.1.1.	Extracción de ARN total de hojas de chalote	45
7.2.1.2.	Síntesis de ADNc viral, amplificación de ADN viral y visualización de bandas obtenidas	45
7.2.2.	Cultivo in-vitro de meristemas apicales de chalote para la limpieza de virus ...	46
7.2.3.	Detección viral en plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales y termoterapia	46
8.	Discusión.....	47

8.1. Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales	47
8.1.1. Regeneración de plantas a partir de meristemas apicales de cebolla chalote.	47
8.1.2. Enraizamiento, generación de bulbos y aclimatación de plántulas de chalote	49
8.2. Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV	52
9. Conclusiones	55
10. Recomendaciones	56
11. Bibliografía	57
12. Tablas	65
13. Figuras	66
14. Anexos	76

Índice de Tablas, Figuras y Anexos

Tabla 1: Resumen de los tres ensayos realizados para la estandarización del cultivo in vitro de chalote (#plantas vivas/# plantas sembradas)	65
Figura 1: Esquema del proceso de regeneración de plántulas de chalote a partir de cultivo de meristemas apicales.	66
Figura 2: Esquema del proceso de aclimatación de plantas de chalote	67
Figura 3: Efecto del tiempo de frío en la ruptura de dormancia y la regeneración de plántulas de chalote a partir de meristemas apicales.	68
Figura 4: Comparación del tamaño de las plántulas regeneradas en las dos combinaciones de hormonas suplementadas en medio de inducción a las 4 semanas luego de la siembra de meristemas.	69
Figura 5: Comparación de la concentración de sacarosa en el crecimiento de plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales en medio de embulbamiento en el ensayo No 2.	70
Figura 6: Efecto de la concentración de sacarosa para el ensayo No. 3 con ancymidol en el crecimiento de plántulas regeneradas a partir de meristemas apicales.	71
Figura 7: Comparación de los efectos de la concentración de sacarosa suplementada en medio de embulbamiento con ancymidol, en la formación de bulbos en chalote.	72
Figura 8: ARN total extraído de 13 muestras de hojas de chalote. Gel de agarosa 1.5%. L: Ladder 100bp (Invitrogen); 1-13: Muestras de ARN de chalote.	73
Figura 9. Detección de OYDV de chalote previo al proceso de limpieza de virus.	73

Figura 10: Efecto de la termoterapia en la regeneración de plántulas de chalote a partir de meristemas apicales. N: No regeneración; C: Contaminación	74
Figura 11: Detección de OYDV de chalote posterior al proceso de limpieza de virus mediante cultivo de meristemas apicales.....	75
Figura 12. Detección de OYDV de chalote posterior al proceso de limpieza de virus mediante cultivo de meristemas apicales y tratamiento con termoterapia.	75
Anexo 1: Síntomas de OYDV en plantas indicadoras (A) y micrografía electrónica de virus OYDV (B) (Tomado de Mahmoud et al. 2007).	76
Anexo 2: Cuantificaciones ARN total extraído de hojas de cebolla chalote regeneradas a partir de cultivo de meristemas apicales (Control).....	77
Anexo 3: Cuantificaciones de ARN total de hojas de cebolla chalote regeneradas a partir de cultivo de meristemas apicales y termoterapia	78

1. Introducción

1.1. *Allium cepa*

El género *Allium* se ubica dentro de la familia Amaryllidaceae y se distribuye ampliamente en zonas subtropicales (Fritsch y Friensen, 2002). Las regiones con mayor diversidad son el área del Mediterráneo, Asia central y Paquistán. El género se desarrolló en sus inicios en zonas abiertas y soleadas, con humedad moderada, pero en la actualidad ocupa múltiples nichos, incluyendo los valles interandinos en América del Sur (Arifin et al., 2000). Posee cerca de 750 especies perennes que presentan órganos subterráneos como bulbos, raíces modificadas o rizomas para almacenar nutrientes. También existen variedades que se han adaptado a diferentes fotoperiodos y temperaturas (Stearn, 1992).

Allium cepa se caracteriza por tener hojas cilíndricas, huecas, dísticas y en su base forman bulbos globulares o cilíndricos. Los bulbos tienen un disco basal reducido a manera de rizoma. Almacenan principalmente azúcares, en su mayoría fructanos (Fritsch y Friensen, 2002). Las flores son triméricas, actinomórficas, hipóginas, los ovarios triloculares tienen dos o más óvulos por lóculo. Se produce sulfóxido de cisteína debido a reacciones enzimáticas durante la descomposición de las proteínas, compuesto que da el olor característico a las diferentes especies del género (Randle y Lancaster, 2002).

Gracias a una alta selección artificial, existe una gran variedad de tamaños, colores (rojos, blancos, amarillos, rosados, púrpuras y violetas) y formas de los bulbos (globulosos, botella o planos). Esta selección está relacionada directamente con la calidad del bulbo en cuanto a su sabor y capacidad de formar múltiples bulbos (Fritsch y Friensen, 2002; Currah y Proctor, 1990). Mientras que, órganos como las flores que no han sido sometidos a selección directa no muestran mayores variaciones (Fritsch y Friensen, 2002).

1.2. *Allium cepa* var. *aggregatum*

Su nombre común es cebolla chalote, ‘shallot’ en inglés y ‘échalotte’ en francés. Es una variedad de *Allium cepa*, que se caracteriza porque forma grupos de bulbos unidos por un mismo disco basal, mientras que la cebolla común (*Allium cepa* L.) solo forma un bulbo principal. Es originaria del centro y sudeste de Asia, y actualmente está distribuida por el resto del mundo (Fritsch y Friensen, 2002). Posee un mayor contenido de sólidos (16-33%), que la cebolla común (7-15%), entre los que se menciona ácidos grasos, azúcares y compuestos sulfurados (Currah y Proctor, 1990; Messiaen et al., 1994). Esto aumenta su valor gastronómico en la cocina gourmet ya que le confiere un olor y sabor mucho más astringente y una consistencia más dura (Grubben, 1994; Fritsch y Friensen, 2002). De esta manera la cebolla chalote es un producto altamente valorado en el mercado europeo (Messiaen et al., 1994), estadounidense (Jones y Mann, 1963) y sudamericano (Galmarini, 1997).

Adicionalmente la cebolla chalote tiene propiedades nutraceuticas relevantes asociados con su alto contenido de sólidos, pues se ha encontrado que los extractos de chalote tienen actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias Gram-positivas (Dankert et al., 1979; Currah y Proctor, 1990). Extractos que al ser ingeridos de manera prolongada previene la formación de glóbulos rojos anormales en conejos con hipercolesterolemia (Tappayuthpijarn et al., 1989). En estudios realizados por Caldes y Prescott (1973) se encontró la presencia de un compuesto con actividad antagonista en el desarrollo de leucemia.

La cebolla chalote se propaga principalmente de forma vegetativa, debido a que no produce flores ni semillas en países que no son de cuatro estaciones (Currah y Proctor, 1990). Las ventajas de esto es una producción uniforme y la preservación de su sabor y propiedades nutraceuticas (Rabinowitch, 2002). Las desventajas serían mayor tiempo para la obtención del material vegetal para el inicio del cultivo, necesidad de espacios grandes para el almacenamiento y acumulación de virus en el tejido vegetal que será usado como semilla. Además, la persistencia de enfermedades virales en el cultivo se incrementa por la falta de ciclos de reproducción sexual (Walkey, 2002).

El cultivo de cebolla chalote es reducido a nivel mundial, se encuentra localizado en países con climas templados (Grubben, 1994), en donde la producción de cebolla común se dificulta por la falta de épocas frías (Currah y Proctor, 1990). En las zonas altas de países como Indonesia, Tailandia, Uganda, Perú y Ecuador se cultiva la cebolla chalote gracias a su tolerancia a alta temperatura y humedad, resistencia a algunas enfermedades y mayor tiempo de vida de almacén (Currah y Proctor, 1990).

1.2.1. Situación de la chalote en el Ecuador

La cebolla chalote se cultiva en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua donde es considerada como una variedad de cebolla colorada. Por lo tanto, en las estadísticas de producción se la incluye dentro de la cebolla colorada, roja o paiteña que se comercializa como producto fresco o seco. Se la utiliza en todo el país como parte de los condimentos de la comida tradicional.

En cuanto a la cebolla colorada, el Ministerio de Agricultura del Ecuador registra como provincias en donde se la cultiva (de mayor a menor producción): Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Tungurahua, Manabí, Azuay, Carchi, Loja, Imbabura y El Oro. Durante el año

2013 se registraron variaciones positivas y negativas en la producción según la zona de cultivo debido al bajo precio de la cebolla y la importación ilegal desde el Perú. La productividad se ha mantenido constante entre 40 000 y 60 000 Kg por hectárea y el costo de producción se encuentra entre 0,14 y 0,16 dólares por Kg. Cabe recalcar que el 95% de la cebolla que es vendida en mercados zonales es importada, mientras que únicamente el 5% corresponde a la producción local (Banco Central del Ecuador, 2014). El área total plantada con cebolla colorada en todo el país para el 2013 fue de 2516 ha y una producción de 67300 t aproximadamente. De la producción nacional, se destina 94% para el mercado, 4% para autoconsumo y 2% se usa como semilla (SINAGAP, 2014).

El crecimiento de la producción para el 2013, de acuerdo con las estadísticas del Banco Central del Ecuador (2014), se dio con mayor fuerza en las provincias de Manabí (Portoviejo y Crucita) y Loja (Saraguro y Zapotillo). La superficie cosechada aumentó entre un 15% al 20% con relación al año 2012. El Banco Nacional de Fomento (2014) concede créditos anuales para el cultivo de cebolla a sectores agrícolas. Entre los meses de enero a marzo del presente año se ha otorgado \$63.235 en total, siendo Tungurahua la provincia con el mayor monto de \$31,711 (SINAGAP, 2014).

El principal destino de la cebolla colorada es el mercado interno, en donde los precios por kilogramo oscilan entre \$0,30 y \$0,50 en fresco y entre \$0,40 y \$0,60 en seco. Las exportaciones se incrementaron, de 273.63 t en el año 2012 a 641,04 t con 51,540 dólares de FOB en 2013 (Banco Central del Ecuador, 2014). Por el contrario, las importaciones de cebolla decrecieron en 26.2% en el último año, con un total para el 2013 de 20,265.20 t (SINAGAP, 2013). Esto indica que existe una oportunidad para el crecimiento del

mercado, con el que se pueda solventar el consumo interno y se pueda llegar a exportar sin necesidad de ampliar la frontera agrícola.

1.3. Problemas en el cultivo de cebolla chalote

Los principales problemas que afectan al cultivo de cebolla chalote son los hongos como *Peronospora destructor*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis alli*; las plagas como *Delia antiqua* o nemátodos que pueden ser controladas mediante una adecuada rotación del cultivo y buenas prácticas agrícolas (EPPO, 2001). Las infecciones virales también afectan a este cultivo, pero no pueden ser erradicadas o controladas en campo.

1.3.1. Infecciones virales

Las infecciones virales están relacionadas con bajos rendimientos y pérdidas agrícolas de billones de dólares al año, pueden llegar a representar el 80% de la pérdida de la producción por hectárea en cultivos del género *Allium* (Shiboleth et al., 2008; Conci et al., 2003). Son más comunes en lugares tropicales donde hay vegetación siempre verde. Provocan graves daños en los cultivos ya que reducen el vigor y rendimiento de la planta. Los cultivos más afectados y con cargas virales cada vez mayores se propagan vegetativamente como la papa, ajo, yuca, remolacha, y cebolla (Loebenstein, 2008).

Los virus son partículas genéticas inertes que tienen ciclos de vida intercelulares e intracelulares (Regenmortel, 2008; Lazarowitz y Beachy, 1999). Los virus que infectan a plantas presentan tamaños que oscilan entre 300 y 900 nanómetros. Su genoma puede ser de ADN ó ARN de cadena simple de polaridad negativa o positiva rodeado por una cápside proteínica (Hull, 2001). Se pueden dispersar por manipulación mecánica, semillas o vectores como bacterias, hongos, nemátodos o insectos (Blanc, 2008). Los virus ingresan a la célula por aberturas de la pared celular y una vez adentro, se replican y se dispersan a

otras células a través de plasmodesmos que es una estructura de la pared celular que permite la comunicación entre célula y célula (Roberts, 2005). Este proceso se da gracias a proteínas de movimiento especializadas que permiten el paso de ácidos nucleicos de una célula a otra (Citovsky y Zambryski, 2005).

Existen infecciones virales que se presentan por más de un virus debido a la formación de un complejo viral. En el ajo (*Allium sativum*) por ejemplo se han reportado hasta doce virus diferentes en un mismo cultivo (Conci et al., 2003). En la cebolla chalote también se han reportado infecciones virales de hasta tres especies: el Virus del Enanismo Amarillo (Onion yellow dwarf virus - OYDV), el virus latente del chalote (Shallot latent virus - SLV) y el Virus de la Rayadura Amarilla del Puerro (Leek Yellow Stripe Virus - LYSV) (Chen et al., 2001). Ciertos síntomas de virus como SLV son casi imperceptibles morfológicamente cuando se presentan solos en un cultivo; por lo tanto, no puede ser identificado visualmente y se requiere de métodos más sensibles de detección. Pero, cuando SLV se encuentra en un mismo cultivo con otros virus como OYDV o LYSV los síntomas se intensifican y producen mayores pérdidas en los cultivos (Conci et al., 2003).

1.3.1.1. Virus del enanismo amarillo – Onion yellow dwarf virus (OYDV)

El virus del enanismo amarillo de la cebolla pertenece al género potyvirus y a la familia Potyviridae (Mahmoud et al., 2007). Es un virus filamentoso de 10.5 Kb de ARN de cadena simple de sentido positivo con una cola de poliadenina. No presenta membrana externa y su cápside está formada por un único tipo de proteína. Su genoma codifica para una sola poliproteína de 385 kDa que da lugar a todas las proteínas del virus (Chen et al., 2003). Su tamaño varía entre 750 - 775 nanómetros de largo y 14 - 16 nanómetros de diámetro (Bos, 1978; Diekmann, 1997).

Estudios han reportado que muchas variaciones del virus encontradas mediante anticuerpos corresponde a la misma especie (Salomon, 2002). Sin embargo, en base a análisis de la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside se determinó que existían dos variantes de OYDV: garlic-type y wakegi-type. Garlic-type incluye a todos los virus aislados de ajo y chalote, y que fueron reportados como onion yellow dwarf virus (OYDV); en tanto que, wakegi-type incluye a los virus reportados como welsh onion yellow stripe virus (WoYSV) y shallot yellow stripe virus (SYSV) que fueron aislados en diferentes especies de *Allium*: ajo, cebolla y puerro (Tsuneyoshi et al., 1998).

OYDV se transmite a través de áfidos o por inoculación mecánica (Salomon, 2002). Los áfidos pertenecen al suborden Sternorrhyncha, son insectos plaga de plantas agrícolas y forestales, y existen más de 50 especies que transmiten virus no persistentes en cultivos. Los áfidos más comunes reportados como vectores de virus son: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *Aphis fabae*, *Brachycaudus cardui* y *Hyalopterus pruni* (Bos, 1978). No se ha reportado la transmisión de este virus por medio de semillas (Salomon, 2002) como en el caso de otros virus como el shallot latent virus (SLV) (Diekmann, 1997). Sin embargo, OYDV si ha sido detectado en polen (Sutic et al., 1999).

La infección de OYDV en la cebolla chalote produce manchas amarillas en las hojas desde la base hasta la punta en forma de mosaico hasta llegar a un color clorótico de aspecto arrugado y flácido cuando la infección es avanzada (Diekmann, 1997). De esta forma impide el correcto desarrollo de la planta, disminuye el tamaño del bulbo, número de hojas, tamaño de las flores, número de semillas y aumenta el tiempo de cosecha (Elnagar et al., 2009; Bagi et al., 2012; Lot et al., 1998). El proceso de floración se ve afectado lo que

inhibe la producción de semillas; y de esta forma la producción de cultivos infectados con OYDV se reduce del 17% al 60% dependiendo de la especie (Elnagar et al., 2009).

La concentración del virus en la planta varía si se encuentra en raíces, hojas, flores o polen. La base de las hojas jóvenes es el órgano que presenta mayor concentración; y por lo tanto, es el origen de la contaminación viral por inoculación mecánica (Sutic et al., 1999). Además, el aumento de carga viral en los individuos provoca un mayor impacto de la sintomatología que puede variar incluso dentro de la misma especie como se demuestra en el estudio de Conci et al. (2003). La cebolla chalote al presentar propagación vegetativa es vulnerable a tener una sintomatología más severa con el paso de las generaciones.

Los factores de virulencia de OYDV están relacionados con la presencia de 91 aminoácidos en el extremo amino de la proteína HCPro que inhibe silenciadores de ARN (Takaki et al., 2006). Esta inhibición evita que la planta pueda reconocer el genoma del virus o sus ARN mensajeros, y los pueda degradar. Además, la proteína HCPro interfiere con el miR171 de la planta que está encargado de la degradación de los ARNm producidos por las proteínas Scarecrow-like, que participan en una correcta división celular y en la regulación de la vía de la biosíntesis de la clorofila (Di Laurencio et al., 1996, Ma et al., 2014). De esta manera se facilita la infección del sistema viral en la planta de forma sistémica. Esta proteína está relacionada con la patogenicidad de virus con síntomas en forma de mosaico y se ha identificado en otras especies de potyvirus como en el virus del mosaico del nabo (Kassachau et al, 2003).

OYDV se ha reportado alrededor del mundo con porcentajes mayores al 50% para cebolla chalote y ajo (Elnagar et al., 2009; Bagi et al., 2012; Conci et al, 2003; Tsuneyoshi et al., 1998, Diekmann, 1997). En Ecuador, no existen reportes sobre su identificación

morfológica, serológica o molecular. Sin embargo, en cultivos de cebolla chalote ubicado en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito, Tumbaco-Pichincha, se encontró plantas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad, cabe recalcar que estos cultivos provienen de colecciones de diferentes provincias del Ecuador (datos no publicados).

1.4. Métodos de detección de virus en plantas

Existen varios métodos de detección de virus en plantas. Dentro de los cuales, el diagnóstico morfológico es la forma más rápida, fácil y menos costosa, porque las infecciones virales producen síntomas en diferentes órganos y lesiones específicas. Inclusive existen protocolos estandarizados para la correcta inspección visual de cargamentos o campos de cultivos de ciertas especies de interés como el café, cacao, banano, ajo, cebolla, puerro, entre otros. Estos lineamientos fueron establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization – FAO) (Diekmann, 1997). Estos diagnósticos se pueden corroborar mediante microscopía electrónica con la cual se observa de forma directa la estructura del virus (Salomon., 2012). También se puede usar plantas indicadoras para la detección; es decir, otras especies de plantas que al ser infectadas con la cepa viral pueden producir síntomas más fáciles de identificar (Walkey, 2002).

En el caso de OYDV, se debe tener en cuenta realizar la detección en hojas adultas, ya que en hojas nuevas los síntomas no son evidentes y pueden existir diagnósticos falsos (Diekmann, 1997; Bagi et al., 2012). Se puede usar también plantas de quinoa (*Chenopodium quinoa* y/o *Chenopodium amaranticolor*); como plantas indicadoras ya que al ser inoculadas con el extracto de hojas de cebolla infectadas por este virus, forma en sus

hojas lesiones circulares cloróticas (Anexo 1) (Walkey, 2002; Mahmoud et al., 2007). Sin embargo, pueden existir falsos positivos ya que la severidad de la sintomatología está correlacionada positivamente a la carga viral ó pueden existir síntomas solapantes de otros virus como el de la rayadura amarilla del puerro (leek yellow stripe virus – LYSV) en infecciones avanzadas (Salomon, 2002; Bagi et al., 2012).

Los métodos de diagnóstico de virus más confiables son: pruebas ELISA del tipo sánduche y el método molecular mediante diferentes tipos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Salomon, 2002).

Las pruebas ELISA-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay es un método de diagnóstico serológico que se usa como rutina a gran escala para la detección de virus en varios cultivos, incluyendo la cebolla (Dovas et al., 2001). Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos marcados que reconocen al virus. El desarrollo de anticuerpos requiere el aislamiento del virus mediante cromatografía de filtración y ultra centrifugación en columnas de gradiente, y se produce antisueros que sirven para colocar en placas micro-titer que con medida de absorbancia a 405nm se detecta si existe o no el virus en la muestra (Walkey, 2002). Estas placas sirven para hacer detecciones simultáneas de hasta 96 muestras en un número igual de pocillos. No obstante, con el uso de esta técnica se han observado falencias; no puede detectar variantes de una misma especie que presente pequeños cambios debido a la gran variabilidad de los genes CP que dan lugar a los epítomos de los anticuerpos (James et al., 2006). Esto da lugar a diagnósticos erróneos, ya sean falsos positivos de que se trata de la misma especie cuando son variantes de la especie, ó a su vez falsos negativos.

Para evitar resultados falsos y con la disponibilidad de una gran cantidad de información de la secuencia genómica de muchos virus, se ha desarrollado ensayos de detección específica de la secuencia blanco basado en PCR que presenta una sensibilidad de 10^2 - 10^5 mayor que pruebas ELISA, además de requerir un tamaño de muestra menor (Salomon, 2002). Existen varios tipos de PCR que pueden ser utilizadas para la detección viral, sin embargo, el más utilizado es RT-PCR.

RT-PCR es la técnica más sensible y no tan costosa para la detección viral ya que utiliza primers específicos para el virus y se amplifica regiones conservadas. Pueden usarse primers degenerados para que se alineen con un mayor cantidad de secuencias y así evitar falsos negativos (Salomon, 2002). En caso de requerirse un estudio más amplio se puede usar una RT-PCR multiplex que permite identificar más de un virus a la vez, con lo cual se baja los costos y tiempo (James et al., 2006). Si se desea aumentar la sensibilidad de la prueba se puede realizar una qRT-PCR con la que incluso se obtiene como resultado la cantidad de virus por volumen que la planta posee. Sin embargo, este procedimiento es más costoso. Por lo tanto, al momento de decidir qué técnica utilizar para la detección de virus se debe realizar un análisis de la sensibilidad y costo, en base a los objetivos del estudio a realizarse.

1.5. Métodos de erradicación de virus en plantas

Se ha probado la eficacia de cuatro métodos de eliminación de virus sin que sean selectivos para un determinado cultivo: cultivo de meristemas, quimioterapia, electroterapia y termoterapia (Pannatoni, 2013).

El cultivo de meristemas se basa en el aislamiento de un domo apical (células dediferenciadas) de menos de 1 mm de longitud en condiciones de cultivo reguladas. (Grout, B. 1990). El meristema aislado se desarrolla y se elonga como si fuera parte de la planta original debido a los reguladores de crecimiento que se encuentran en el medio de cultivo. Las auxinas son reguladores de crecimiento vitales para promover el crecimiento inicial del meristema, sin embargo generalmente se suplementa al medio de cultivo bajas concentraciones de auxinas con altos niveles de citoquininas (Abdelnour et al., 2006).

Una ventaja de esta técnica es la estabilidad genética de la nueva planta ya que los brotes se regeneran directamente a partir del meristema sin necesidad de pasar por una etapa de callo. Otra ventaja es su alto potencial de propagación (Roca, J. 1984). Por lo tanto, el cultivo de meristemas es un método utilizado para la conservación de germoplasma, micropropagación de plantas y producción de material libre de virus (Shiboleth, 2001).

El cultivo de meristemas es el método más conocido y estandarizado para erradicación de virus debido a que las células meristemáticas no presentan vascularización; es decir, no existe unión directa de las células meristemáticas con otros tejidos a través de plasmodesmos, xilema ó floema. Este tipo de células recibe los nutrientes necesarios para su desarrollo por medio de transporte activo o difusión simple, sin modificación de la membrana o pared celular como en el caso de los demás tejidos vegetales. Los virus al ser de tamaños grandes como para pasar por difusión simple, se transportan e infectan otras células por medio de plasmodesmos, xilema y floema. Entonces, el tejido meristemático no permite el paso del virus a su interior. Por lo tanto, una planta regenerada a partir de éste tipo de tejido será libre de virus (Salomon et al., 1996).

Sin embargo, los porcentajes de plántulas libres de virus regeneradas con este método son bajos y varían incluso entre variedades de la misma especie (Ucman et al., 1998). Estos porcentajes son el resultado de arduo trabajo y tiempo, ya que el tejido meristemático no se distingue fácilmente del resto y se trata de manipulación mecánica precisa ya que los tejidos adyacentes a estas células normalmente están infectados de virus (Walkey, 1987). Para mejorar los porcentajes de plantas libres de virus se han requerido combinar con otros métodos físicos, químicos o térmicos (Salomon, 2002).

La quimioterapia consiste en el uso de químicos como la ribavirina, que interfiere la replicación viral. La ribavirina es un nucleótido sintético modificado que se inserta en el genoma viral, bloquea su replicación y por lo tanto, no da lugar a nuevos genomas. No interfiere en la replicación celular, entonces, no se observa disminución en la tasa de regeneración de la planta (Fletcher et al., 1998). El porcentaje de eliminación de virus varía dependiendo del tipo de explante utilizado, la concentración de ribavirina y la variedad vegetal utilizada (Koch et al., 1995; Verbeek et al., 1995; Shibolet et al., 2001). Según reportes de Pannatoni et al. (2013), la tasa de supervivencia de las plantas es decreciente con el aumento de concentración de ribavirina. En esta misma publicación se reporta que la combinación con electroterapia aumentaría el número de plántulas libres de virus obtenido.

La termoterapia se basa en la exposición del explante a temperaturas a las cuales los virus no pueden ensamblar nuevos viriones, se degradan y de esta manera las nuevas células no pueden ser infectadas. El problema de este método es que a pesar de tener porcentajes de eliminación de virus más altos, el uso de temperaturas muy elevadas también puede afectar al correcto desarrollo de la planta (Shibolet et al., 2006). La temperatura a la cual se somete el explante varía entre 35-55°C dependiendo del género, la especie e incluso la

variedad de cultivo, como también del tiempo de exposición comprendido entre 4 a 30 días (Almaarri et al., 2011; Díaz et al., 2007; Torres et al., 2000; Su Chuang y Wu-Shann, 1994; Conci y Nome, 1991). Para cebolla chalote se aplica 35°C durante 4 días para obtener aproximadamente el 50% de eliminación de virus (Rees et al., 2012; Su Chuang y Wu-Shann, 1994).

Las infecciones virales constituyen uno de los principales problemas para el cultivo de cebolla chalote porque deterioran la calidad de los bulbos y reducen la productividad. Se necesita material libre de virus para su cultivo debido a que esta cebolla se propaga vegetativamente y la carga viral aumenta en cada generación. En base a los antecedentes presentados, en este estudio se busca estandarizar un protocolo para el cultivo in-vitro de meristemas apicales de chalote que se pueda combinar con termoterapia para regenerar plantas libres del virus OYDV.

2. Objetivo

2.1. Objetivo general

Estandarizar un protocolo de regeneración in vitro de plantas de chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a partir de meristemas apicales para obtener plantas libres de virus.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el tiempo de frío ideal para la ruptura de dormancia de chalote para la introducción al cultivo in vitro.
- Optimizar el porcentaje de regeneración de plantas de chalote a partir de meristemas apicales.
- Detectar el porcentaje de incidencia del virus del enanismo amarillo (OYDV) en plantas de chalote de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.
- Determinar la eficiencia del cultivo de meristemas apicales para la generación de plantas de chalote libres de OYDV
- Determinar la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV

3. Área de estudio

El material vegetal utilizado provino de un programa de selección de chalotes, que se desarrolla en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), con materiales provenientes de la provincia de Carchi y Chimborazo. La Granja de la USFQ está ubicada en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito, provincia de Pichincha a 2400 msnm, 78°24' longitud oeste y 00°23' latitud sur. El cultivo in-vitro y el análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales), Cumbayá – Ecuador.

4. Justificación

La importancia de la cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) radica en que en comparación con la cebolla común (*Allium cepa* var. *cepa*) se diferencia por dos características deseables: la formación de varios bulbos a partir de un solo disco basal y un mayor contenido de sólidos. El mayor número de bulbos por planta mejora su productividad, reduce costos de producción y facilita la propagación vegetativa al tener más bulbos disponibles como semilla. Por otro lado, al tener un mayor contenido de sólidos la cebolla chalote tiene mayor cantidad de azúcares, proteínas y minerales que aumentan su valor gastronómico y nutracéutico (Robledo-Pazet al., 2000; Currah y Proctor, 1990; Messiaen et al., 1994).

A pesar de que en Ecuador el cultivo de chalote es limitado, se lo puede encontrar en Tungurahua, Carchi y Chimborazo. Una ventaja de este cultivo es la facilidad de tener dos cosechas por año lo que permite disponer del producto de manera constante sin necesidad de grandes espacios de almacenamiento, lo que reduce a su vez el costo de producción (Currah y Proctor, 1990). Debido a que no está registrado como una variedad, no se tiene datos estadísticos de producción ni de demanda, pues se lo agrupa dentro de las cebollas rojas o coloradas. El cultivo de cebolla colorada se extiende por todo el país, sin embargo, su producción no permite la cobertura total de la demanda del mercado, y es necesaria la importación de cebolla colorada desde Perú (SINAGAP, 2014). Como la demanda de cebolla colorada no está satisfecha, se infiere que tampoco está satisfecha la demanda de chalote.

Las infecciones virales en cultivos del género *Allium* pueden ser devastadoras al punto de reducir su producción hasta el 80% (Shiboleth et al., 2006). Esto resulta en pérdidas económicas grandes para los productores. En el caso de la cebolla chalote las enfermedades virales, específicamente el virus del enanismo amarillo (OYDV) reduce la producción entre 17% y 60%. Los síntomas se intensifican al propagar la cebolla chalote por medios vegetativos, ya que la concentración de virus en la planta aumenta de generación en generación, y la severidad de la sintomatología y su efecto sobre la producción está directamente relacionadas con la carga viral (Diekmann, 1997).

Actualmente, el control de la contaminación viral de plantas únicamente se da mediante métodos físicos al evitar que áfidos portadores del virus se dispersen e infecten cultivos sanos. Este método no es válido a largo plazo porque se debe adquirir constantemente nuevas plantas libres de virus (Salomon et al., 1996). Por otro lado, al existir virus intercelulares que afecta a plantas, no existe un método agrícola que pueda controlar su impacto como en el caso de hongos o bacterias. Tampoco se han reportado variedades de cebolla chalote resistentes a virus ni se ha logrado desarrollar métodos para eliminar virus en el campo (Diekmann, 1997; Salomon, 2002). Los métodos disponibles para erradicación de virus se basan en técnicas biotecnológicas de cultivo in vitro de meristemas, con lo cual se obtienen bulbos libres de virus que sirven como semilla para el inicio del cultivo (Lapitan et al., 1991; Fletcher et al., 1998).

Previamente, para este trabajo se realizó la tesis de Ramírez (2013) en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, en la cual se estandarizó un protocolo de identificación molecular de los virus OYDV y SLV en plantas de chalote. Ramírez (2013) reportó 100% de infección de los dos virus para 55 muestras de plantas de

chalote analizadas. Además, estableció un protocolo para la producción de plántulas libres de virus mediante cultivo in vitro de meristemas apicales acompañado de quimioterapia con una eficiencia máxima de 40%.

Sin embargo, Ramírez (2013) reportó un porcentaje de regeneración del 33% y ninguna planta aclimatada. A pesar de tener porcentajes de limpieza de virus prometedores, no se puede continuar con la propagación a gran escala sin un protocolo in vitro eficiente en la producción de plantas aclimatadas. El éxito de la producción de material libre de virus depende de tener bulbos que cumplan las características necesarias de una semilla calificada.

Con estos antecedentes, el objetivo de este proyecto es obtener plantas regeneradas a partir de meristemas apicales en los cuales se pueden aplicar otros tratamientos para obtener plantas libres de virus. Entonces, con este protocolo se espera mejorar la producción de bulbo-semilla libre de virus, contribuir a mejorar la producción de la cebolla chalote en el país y promover un mercado nuevo para esta variedad de cebolla.

5. Materiales

5.1. Colección del material vegetal y ruptura de dormancia

- Bulbos de chalote de la familia 10S07(3)
- Refrigeradora (Lab Line Ili)
- Fundas de papel

5.2. Introducción in vitro de chalote

5.2.1. Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote

- Hipoclorito de sodio 4,5%
- Etanol 70%
- Tween 20 (Sigma)
- Agua destilada estéril
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench)
- Potenciómetro (Orion Star A111 Thermo Scientific™)
- Autoclave (Trident EA632)

5.3. Cultivo in vitro de meristemas apicales de chalote

- Frascos de vidrio de 477mL y 534mL
- Tubos de ensayo de vidrio de 50mL
- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) pH 5,8.
- Ácido naftalénacético - NAA (Sigma)
- 6-Benzylaminopurina – BA (Sigma)
- Ancymidol (Sigma)

- Benomyl (Agripac)
- Agar (Sigma)
- Sacarosa (azúcar de mesa: San Carlos)
- Carbón activado (Sigma)
- Microscopio de disección (Thermo scientific)
- Potenciómetro (Thermo scientific)
- Balanza (Sartorius LA230S)
- Cámara de flujo laminar (Labconco)
- Cámara de fotos (Canon EOS Rebel)

5.4. Termoterapia

- Cámara con control de temperatura (MaxQ 400 Barnstead Lab Line)
- Meristemas apicales de chalote en medio de inducción.

5.5. Aclimatación de plantas de chalote

- Tierra (Agro Terra Potting Mix – Canterbury Research S.A.)
- Agua destilada estéril
- Vasijas de barro
- Frascos de vidrio de 477mL y 1900mL

5.6. Identificación de OYDV

5.6.1. Extracción de ARN total

- TRIzol® (Invitrogen)
- Etanol 70%
- Isopropanol 99,5% (Sigma)

- Nitrógeno líquido
- Cloroformo 99,8% (Sigma)
- Agua desmineralizada tratada con DEPC (Invitrogen)
- Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415D)
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)

5.6.2. Cuantificación de ARN total y visualización en gel de agarosa

- NanoDrop (Thermo scientific 1000)
- 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)
- Fuente de poder (Scientific Co. EPS-300 II C.B.S)
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

5.6.3. Síntesis de la primera hebra de ADNc viral por transcripción inversa

- ARN total extraído de hojas de chalote ($100\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
- $0,2\ \mu\text{M}$ de primer reverse: 5'CGATTAGCTGCCCCTCTAAC3' (Mahmoud et al, 2007)
- SuperScript III (Invitrogen)
- 5X First-Strand Buffer (Invitrogen)

- Ditiotreititol DTT (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138 (Biometra)

5.6.4. Amplificación de ADN viral mediante PCR

- ADNc viral obtenido por transcripción inversa (ver sección 6.5.3)
- 10X PCR Amplification Buffer (Invitrogen)
- 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 200 µM de dNTPs (Invitrogen)
- 0,2 µM de primer reverse para OYDV:
5'CGATTAGCTGCCCCCTCTAAC3'(Mahmoud et al, 2007)
- 0,2 µM de primer forward para OYDV: 5'CGAAGCAAATTGCCAAGCAG3'
(Mahmoud et al, 2007)
- DNA Taq polimerasa (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138 (Biometra)

5.6.5. Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa 0,8% (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)
- Fuente de poder (Scientific Co. EPS-300 II C.B.S)
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

6. Métodos

6.1. Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales

6.1.1. Colección del material vegetal

Se seleccionaron bulbos de chalote pertenecientes a la familia 11SO4 y 10S07(3) provenientes de un programa de mejora genética iniciado en octubre de 2010 en la Granja Experimental de la USFQ en Tumbaco. La familia 11SO4 se utilizó en el Ensayo No. 1 y la familia 10S07(3) en el Ensayo No. 2 y 3. Los bulbos luego de la cosecha fueron sometidos a un secado inicial de 4 semanas en estanterías de madera bajo condiciones ambientales (temperatura máxima de 25°C y mínima de 8°C). Al finalizar este periodo las hojas externas estaban deshidratadas, lo que evita la proliferación de hongos.

6.1.2. Introducción in vitro de chalote

6.1.2.1. Ruptura de dormancia mediante dos tiempos de frío

Después del proceso de secado, en un primer ensayo los bulbos fueron almacenados a 4°C por dos y cuatro semanas en la refrigeradora del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Se usaron 50 bulbos de chalote para cada periodo de frío. Para los tres siguientes ensayos se sometieron los bulbos a 4°C durante 4 semanas. Este tratamiento prepara a los meristemas para la brotación cuando se los coloca en el medio de cultivo (Fletcher et al., 1998).

6.1.3. Desinfección e introducción de discos basales de chalote a medio de inducción

Luego de transcurrido el tratamiento en frío, independientemente del tiempo, se lavó los bulbos con agua corriente por 10 minutos, se retiró los restos de tierra y descartó las hojas secas. Se cortó un tercio de la longitud del bulbo de forma transversal manteniendo la parte basal. Dentro de la cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench), se colocó el disco basal en un vaso de precipitación con etanol al 70% por 10 min, luego se eliminó el etanol mediante un cernidor previamente esterilizado y se agregó el hipoclorito de sodio NaClO al 4,5% con tres gotas de Tween 20 hasta cubrir el disco basal. Este tratamiento se mantuvo durante 30 min.

Se lavó los discos basales con agua destilada estéril, y se retiró los catafilos externos hasta obtener un explante de 1,5 cm de diámetro y 1 cm de altura. Se colocó cuatro explantes por frasco de vidrio con 50 mL de medio de inducción: MS + hormonas, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5g.L⁻¹ y agar 7g.L⁻¹. Las hormonas se suplementaron en dos concentraciones: C1 (5 uM NAA+ 5uM BAP) y C2 (1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP). Se sembró 50 discos basales para cada concentración en el primer ensayo, 75 en el segundo ensayo y 100 en el tercer ensayo (Tabla 1).

6.1.4. Aislamiento y cultivo de meristemas apicales de chalote

Luego de una semana en el medio de inducción, usando el microscopio de disección se procedió a extraer el meristema apical de cada disco basal según el esquema de la Figura 1, se lo colocó en un tubo de ensayo de 50mL con 20mL del medio de inducción, correspondiente al medio inicial, por cuatro semanas. Se mantuvieron los meristemas apicales a 25°C aproximadamente y un fotoperiodo de 16 horas luz.

6.1.5. Enraizamiento y generación de bulbos de plántulas de chalote.

Se pasó las plántulas formadas a partir de los meristemas apicales al medio de crecimiento: medio MS+ sacarosa 30 g.L^{-1} + agar 7 g.L^{-1} , por cuatro semanas más. Luego, para el primer ensayo estas plántulas se las colocó en el medio de embulbamiento ME1: medio MS + 60 g.L^{-1} sacarosa + 5 g.L^{-1} carbón activado y agar 7 g.L^{-1} (Ramírez, 2013), durante 12 semanas. Al no observar embulbamiento en ninguna plántula, en el siguiente ensayo se probaron 3 concentraciones de sacarosa: 50 g.L^{-1} (ME2a), 70 g.L^{-1} (ME2b) ó 90 g.L^{-1} (ME2c). Al no observar embulbamiento evidente luego de 12 semanas, en el tercer y último ensayo se probó el medio ME3: MS + sacarosa + $10 \mu\text{M}$ ancymidol + 300 mg.L^{-1} NaPO_4 y agar 7 g.L^{-1} (Le Guen et al., 2002). En este último ensayo se probó dos concentraciones de sacarosa para ME3: 30 g.L^{-1} (ME3a) y 50 g.L^{-1} (ME3b). Luego de 12 a 15 semanas del cultivo a 25°C aproximadamente y un fotoperiodo de 16 horas luz, las plantas con raíces y bulbo de alrededor de 1cm de diámetro pasaron al proceso de aclimatación. Se realizó la prueba chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher en el programa estadístico Minitab (Minitab17, 2013) para encontrar diferencias significativas entre los medios ME3a y ME3b.

6.1.6. Aclimatación de plantas de chalote

Se colocó las plántulas con bulbo y raíces en macetas de barro con tierra de la Granja de la USFQ previamente esterilizada (15min, 121°C , 15PSI). Las macetas fueron colocadas dentro de un frasco de vidrio de 1900mL. Los frascos se taparon con plástico transparente y rotuló y se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25°C aproximadamente y con un fotoperiodo de 16 horas luz. Luego de 4 días se retiró el plástico transparente totalmente y se las regó con agua destilada estéril tres veces por semana. Después de 3 meses las plantas se pasaron a macetas plásticas de 2100mL con tierra y se colocaron en el invernadero de la USFQ (Figura 2).

6.2. Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV

6.2.1. Identificación de OYDV en plantas de chalote obtenidos del campo para este estudio

6.2.1.1. Extracción de ARN total de hojas de chalote

Se basó en el protocolo estandarizado por Ramírez (2013). Se seleccionaron bulbos de chalote pertenecientes a la familia 10S07(3) provenientes de la Granja Experimental de la USFQ en Tumbaco. Se trituró en un mortero 100 mg de hojas frescas de plantas de chalote usando nitrógeno líquido. El polvo resultante se mezcló con 1ml de TRIzol en un tubo eppendorf y se dejó reposar por 20 min. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 15 min. Se rescató la fase líquida, y se agregó 240 uL de cloroformo 99,8%, se dejó reposar por 3 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. Se colocó el sobrenadante transparente en un nuevo tubo con 500 uL de isopropanol 99,5%, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a 4°C. Se descartó toda la fase líquida, se lavó el pellet resultante con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min. Se retiró el etanol remanente y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar. Se resuspendió el pellet de ARN en 50 uL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -70°C. Se midió la concentración de ARN usando el NanoDrop Thermo Scientific 1000 y la calidad de ARN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% a 80V por 60 min. Finalmente, se diluyó el ARN obtenido a 100 ng/uL, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2.1.2. Síntesis de la primera hebra de ADNc viral

Se usó el primer específico para la región central del gen de la proteína de la cápside de OYDV descrito por Mahmoud et al. (2007) primer reverse: 5'CAACATCGATTYTCTC3'. La reacción tuvo un volumen final de 20 uL con 0,2 uM del primer reverse del virus, 1uL de ARN total a 100 ng/uL (ver sección 7.1.1), 20U de retrotranscriptasa M-MuLV (SuperScript III, Invitrogen), 0,5 uM de dNTP mix, 1X de First-Strand Buffer y 10 mM de DTT. Se realizó una denaturación inicial a 65°C por 5 min, sin la adición de la retrotranscriptasa. Al finalizar este paso, se adicionó la retrotranscriptasa y se incubó por 1 h en el termociclador a 48°C, luego de lo cual se inactivó la enzima calentando la mezcla a 70°C por 15 min. Una vez concluida la reacción, se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2.1.3. Amplificación y visualización de bandas de ADN complementario.

Se usó los primers específicos para OYDV descritos por Mahmoud et al. (2007): primer forward: 5'GTGGTNTGGAATTAC3' y el primer reverse: 5'CAACATCGATTYTCTC3'. La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 10 uL que contenía 1uL del producto de la retrotranscripción (ver sección 7.2.1.2) como templado, 1X de PCR Amplification Buffer, 0,2 uM de dNTP mix, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 uM de cada primer del virus y 1U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Los tiempos de ciclado fueron: 10 min a 95°C, después 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 61°C y 1 min a 72°C, extensión final 5 min a 72°C. Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con SyberSafe®. Finalmente, se fotografió el gel usando un transiluminador UV con un software para captura de imagen y cámara incorporada (Biorad XR documentation system).

6.2.2. Cultivo in vitro de meristemas apicales de chalote y termoterapia

Para el cultivo de meristemas se usó bulbos de chalote infectados con OYDV y se siguió el protocolo de la sección 6.1. No se realizó con el protocolo estandarizado, sin embargo se utilizó el medio de inducción y de regeneración de MS + 1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5g.L⁻¹, agar 7g.L⁻¹. Para aplicar termoterapia se colocó 35meristemas aislados en medio de inducción a 35°C por 4 días, y luego de este tiempo se los pasó a 25°C para su crecimiento, mientras que 45 meristemas utilizados como control se mantuvieron siempre a 25°C. Después de 4 semanas, se pasó las plantas a medio MS para su crecimiento durante 4 semanas y luego a medio de embudamiento de MS +60g.L⁻¹ sacarosa + 5g.L⁻¹ carbón activado y agar 7g.L⁻¹ durante las siguientes 12 semanas a 25°C aproximadamente y un fotoperiodo de 16 horas luz. Finalmente, las plántulas pasaron a aclimatación (ver sección 6.1.6).

6.2.3. Detección viral en plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales y termoterapia.

Para determinar la eficiencia de la erradicación del virus por medio del cultivo de meristemas y el tratamiento con termoterapia se realizó la detección del virus OYDV mediante RT-PCR (ver sección 6.2.1) de las plantas previo a su aclimatación. Además, se realizaron pruebas estadísticas: chi-cuadrado, g-cuadrada y Fisher en el programa Minitab (Minitab17, 2013) para confirmar la eficiencia de la eliminación del virus OYDV mediante el tratamiento con termoterapia.

7. Resultados

7.1. Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales

7.1.1. Ruptura de dormancia de meristemas apicales de chalote, aislamiento de meristemas apicales y regeneración de plantas de chalote.

Se observó un 100% de brotación en los ensayos No. 1, 2 y 3. En el ensayo No. 1 después del aislamiento de meristemas apicales, se obtuvo un 28-32% más de regeneración de plántulas a partir de meristemas que provenían del tratamiento de 4 semanas a 4°C en comparación con el tratamiento de 2 semanas a 4°C (Figura 3). Por lo tanto, para los dos ensayos posteriores se indujo ruptura de dormancia con tratamiento de frío a 4°C durante 4 semanas (Tabla 1).

En cuanto a la diferencia entre las concentraciones de hormonas, el ensayo uno se encontró un 58% de regeneración con la combinación hormonal C1 (5 uM NAA+ 5uM BAP) y 64% con la combinación C2 (1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP) (Figura 3). Las plántulas bajo la combinación de hormonas C1 presentaron un promedio de crecimiento de 3.36 ± 1.34 cm y las plántulas bajo la combinación C2 un promedio de 4.7 ± 1.5 cm (Figura 4). El mayor porcentaje de regeneración 20/25 (80%) se obtuvo con cuatro semanas de frío para ruptura de dormancia y la concentración hormonal C2, mientras que el menor porcentaje de regeneración 10/25 (40%) se obtuvo con dos semanas de frío y con la concentración hormonal C1 (Tabla 1). En el ensayo No. 2 luego de 4 semanas, se observó un 57% de regeneración con C1 y 61% con C2. A pesar de no observar una clara diferencia en el

porcentaje de regeneración entre C1 y C2, las plántulas regeneradas en medio con la combinación hormonal C2 eran más grandes y más verdes. Por lo tanto, en el ensayo No. 3 se usó una sola combinación de hormonas en el medio de inducción y regeneración (C2: 1.1uM NAA + 8.9uM BAP) con la cual se obtuvo un 68% de regeneración después de 4 semanas.

7.1.2. Enraizamiento y generación de bulbos de plántulas de chalote.

En el ensayo No. 1 las plántulas obtenidas a partir de los meristemas apicales aislados fueron sembradas para la elongación y embulbamiento en medio MS + 60g.L⁻¹ sacarosa + 5g.L⁻¹ carbón activado y agar 7g.L⁻¹ por doce semanas (Ramírez, 2013). Se colocó 43 plántulas de las cuales ninguna formó bulbos, al contrario 36 plántulas presentaron señales de envejecimiento y las 7 restantes aunque presentaban hojas verdes éstas eran delgadas y no presentaron raíces, por lo tanto, estas plantas no pudieron ser aclimatadas.

Debido a esto, en el ensayo No. 2 se probaron tres concentraciones de sacarosa: 50 g.L⁻¹ (ME2a), 70 g.L⁻¹ (ME2b) ó 90 g.L⁻¹ (ME2c). En el medio ME2a se observó crecimiento en el 68,2% (15/22) de plántulas luego de doce semanas, pero solo 4 plántulas formaron bulbo y 5 desarrollaron raíces; mientras que el medio ME2c presentó una menor tasa de crecimiento (34.7%; 8/23) luego de doce semanas, 3 plántulas formaron bulbo y 2 desarrollaron raíces (Figura 5).

Para mejorar el porcentaje de embulbamiento, en el ensayo No. 3 se utilizó el medio ME3: MS + 10uM ancymidol + 300 mg.L⁻¹ NaPO₄ + agar 7g.L⁻¹ (Le Guen et al., 2002) suplementado con dos concentraciones de sacarosa (30 y 50g.L⁻¹). Se utilizó 50g.L⁻¹ porque con esta concentración se observaron los mejores resultados en el ensayo No. 2 y 30g.L⁻¹

porque fue la concentración con mayor porcentaje de embulbamiento reportado por Le Guen (2002).

En el medio ME3a después de quince semanas sólo 12/34 (35%) plántulas crecieron, ninguna presentó bulbillo ni raíces y presentaron 4 ± 0.74 cm de altura promedio, mientras que en el medio ME3b 22/34 (65%) plántulas crecieron, 17/22 (77%) plántulas desarrollaron bulbillo, todas presentaron raíces gruesas y bien formadas, y tenían una altura de $12,54 \pm 2,5$ cm en promedio (Figura 6 y 7). Al realizar la prueba chi-cuadrada para correlacionar la asociación de la concentración vs. plantas con crecimiento usando el software Minitab® (MINITAB, 2014), se encontró diferencias significativas entre la concentración del medio ME3a y ME3b (Chi-cuadrada de Pearson = 11.691, GL = 1, Valor $p = 0.001$; Prueba exacta de Fisher, Valor $p = 0.0013$). Finalmente, todas las plantas con bulbo y raíz fueron llevadas al proceso de aclimatación.

7.1.3. Aclimatación de plantas de chalote

Del ensayo No. 2, se transfirieron a tierra 8 plántulas que provenían del medio ME2a, 3 del medio ME2b y 4 de ME2c, de las cuales sobrevivieron después de un mes 4,1 y 2 plantas respectivamente. Del ensayo No. 3, 11/22 (50%) plantas se aclimataron de forma exitosa, 7 plantas presentaron contaminación por hongos y 4 se secaron luego de cuatro semanas (Tabla 1).

7.2. Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV

7.2.1. Identificación de OYDV en plantas de chalote previo a la limpieza de virus

7.2.1.1. Extracción de ARN total de hojas de chalote

Se extrajo el ARN total de hojas de 80 plantas de chalote que crecieron a partir de los discos basales sembrados in vitro (ver sección 6.1.3). Se obtuvo altas concentraciones de ARN en todas las muestras (en promedio $994.5 \pm 74.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Sin embargo, la variación en la concentración de ARN fue alta desde 911,8 a $540,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. El índice de absorbancia 260nm/280nm fue 1.94 ± 0.08 ; mientras que el índice 260nm/230nm fue de 1.26 ± 0.52 . Al analizar las muestras en los geles de agarosa se puede ver las bandas de ARN de las subunidades ribosomales (28s y 18s) lo que indicó que el proceso de extracción de ARN fue adecuado (Figura 8).

7.2.1.2. Síntesis de ADNc viral, amplificación de ADN viral y visualización de bandas obtenidas

El ARN obtenido fue diluido a una concentración de $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ y se usó como molde para la síntesis de ADNc, usando la enzima SuperScript III (Invitrogen). De la misma manera el ADNc obtenido fue usado como molde para el PCR sin dilución previa. Luego de la amplificación se visualizó las bandas por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se observó en todas las muestras una banda en 601bp para OYVD (Figura 9) que corresponde al tamaño de banda esperado según Majumber et al (2008) y Mahmoud et al. (2007). Estos datos comprueban el 100% de infección de OYDV para las 80 muestras de plantas de chalote analizadas.

7.2.2. Cultivo in-vitro de meristemas apicales de chalote para la limpieza de virus

Se observó diferencias en la regeneración de plantas a partir de meristemas entre las que se expuso al tratamiento con termoterapia y las que no. Después de 4 semanas en medio de inducción, el 71.1% (32/45) de plántulas regeneraron a partir de meristemas apicales con un tamaño promedio de 2.8 ± 1.8 cm con una moda de 3cm; mientras que cuando se combinó con termoterapia regeneraron únicamente un 45.7% (16/35) con un tamaño promedio de 2.1 ± 1.2 cm (Figura 10). Luego de 4 semanas más en medio de elongación, las plántulas del tratamiento sin termoterapia midieron $12,8 \pm 4$ cm promedio y las plántulas del tratamiento con termoterapia $7,09 \pm 3,3$ cm promedio.

Luego de doce semanas en el medio de embudamiento ($MS + 60g.L^{-1}$ sacarosa + $5g.L^{-1}$ carbón activado y agar $7g.L^{-1}$) se obtuvieron 11 plántulas del tratamiento con termoterapia (9 de las cuales presentaron raíces) y 35 plántulas del tratamiento sin termoterapia (20 de éstas presentaron raíces). Todas las plántulas que tuvieron raíces fueron aclimatadas. Sin embargo, después de un mes ninguna planta que provino del tratamiento con termoterapia sobrevivió, mientras que 6 plantas que regeneraron sin tratamiento de termoterapia sí se aclimataron exitosamente.

7.2.3. Detección viral en plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales y termoterapia

Antes de pasar a la fase de aclimatación, se realizó la detección de virus a 11 plántulas del tratamiento con termoterapia y 35 plántulas del tratamiento sin termoterapia. Se extrajo ARN de un pedazo de hoja de 100 mg aproximadamente según el protocolo de extracción previamente establecido (ver literal 7.2.1). De las muestras del control (sin termoterapia) se obtuvo un promedio 594 ± 481.42 ng/uL de ARN y de las muestras del tratamiento (con

termoterapia) 235.93 ± 133.79 ng/uL (Anexo 2 y 3). Los índices 260/230 y 260/280 se encontraron cerca de 2, y por lo tanto, las muestras de ARN obtenidas se consideraron de buena calidad.

Luego de realizar la retrotranscripción y amplificación del ADN viral en las muestras de cebolla chalote, se identificó un 37% de eficiencia en la eliminación de virus OYDV para el control (Figura 11), y 55% de eficiencia para el tratamiento basado en termoterapia (Figura 12). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas (Chi-cuadrada: $p > 0.05$ y Prueba exacta de Fisher: $p > 0.05$) entre las plantas libres de virus regeneradas a partir de cultivo de meristemas y las plantas libres de virus a partir de cultivo de meristemas combinado con termoterapia.

8. Discusión

8.1. Estandarización de un método de regeneración de plántulas de chalote a partir del cultivo de meristemas apicales

8.1.1. Regeneración de plantas a partir de meristemas apicales de cebolla chalote

Para regenerar plantas a partir de meristemas apicales de los chalotes, se compararon dos factores importantes: tiempo de exposición al frío para la ruptura de dormancia y la concentración de hormonas en el medio de regeneración.

En condiciones naturales la brotación de los bulbos de cebolla chalote ocurre luego de un cierto tiempo después de la cosecha dependiendo del genotipo y las condiciones de almacenamiento, debido a que estos tienen un periodo de dormancia (Bufler, 2009).

Estudios de Benkeblia et al., (2003) demostraron que los compuestos fenólicos interfieren indirectamente con el proceso de brotación de bulbos de cebolla y que una baja temperatura (0°C) activa una señal para reducir fenoles, con lo cual se promueve la brotación. Adicionalmente, Ramírez (2013) almacenó bulbos de cebolla chalote a 4°C para preparar a los meristemas para la brotación. Es por esta razón que en este estudio se realizó la comparación de dos tiempos de ruptura de dormancia mediante la exposición de los bulbos de cebolla chalote a 4°C durante 2 y 4 semanas. Se observó que 4 semanas de frío promueve un mayor porcentaje de regeneración de plantas a partir de meristemas apicales que con dos semanas de frío (Figura 3), lo que se podría asociar con una mayor reducción de fenoles en los bulbos (Benkeblia et al., 2003)

En la fase de regeneración de cebolla chalote a partir de meristemas apicales se utilizó dos combinaciones de auxinas y citoquininas en el medio de inducción y regeneración. La combinación C1 (Ramírez, 2013) presenta iguales concentraciones de NAA (5 uM) y de BAP (5 uM), mientras que la C2 (Kahane et al, 1991) tiene concentraciones de BAP (8.9 uM) mayores que de NAA (1.1uM). Después de cuatro semanas, no se observó diferencias significativas en el porcentaje de regeneración de plantas entre las dos combinaciones. Sin embargo, con la combinación C2 (76%, 40%) se obtuvo más porcentaje de regeneración que C1 (80%, 48%). Después de 4 semanas, asimismo, la combinación C2 presentó mayor porcentaje de plántulas con un rango de tamaño superior a 5 cm respecto de C1 (Figura 3). Este efecto podría deberse a la mayor concentración de citoquinina, pues las citoquininas desempeñan un papel fundamental en la estimulación de la regeneración de plantas y por lo tanto se las utiliza en concentraciones mayores que las auxinas, en una relación cercana a 10:1 (Kahane et al, 1991). Esto es consistente con resultados reportados en la mayoría de

especies de *Allium* (Xu et al., 2007; Seabrook et al., 1993; Kahane et al., 1991; Zheng et al., 1999; Le Guen et al. 2002, Shakuntala et al., 1977).

8.1.2. Enraizamiento, generación de bulbos y aclimatación de plántulas de chalote

En el ensayo No. 1 las plántulas obtenidas a partir de los meristemas apicales aislados fueron sembradas en el medio de embulbamiento MS +60g.L⁻¹ sacarosa + 5g.L⁻¹ carbón activado y agar 7g.L⁻¹ por doce semanas a 25°C aproximadamente y con un fotoperiodo de 16 horas luz (Ramírez, 2013). Después de 15 semanas, ninguna plántula presentó embulbamiento y 36 de las 43 plántulas sembradas en este medio presentaron desecación de hojas, deterioro del sistema radicular y crecimiento lento; es decir, senescencia temprana. Generalmente, la senescencia se da en el final del ciclo de vida de plantas cuando alcanzan su madurez debido a variaciones en la expresión génica que detienen el crecimiento e inicia el proceso de muerte celular programada. Sin embargo, la senescencia temprana acelera todos estos procesos en estadios previos a la madurez que generan problemas en el proceso de aclimatación de la planta y finalmente estas plantas no son viables (Randillac y Teyssendier, 1992; Edwards et al., 2012).

Para la formación de bulbos en cultivos del género *Allium* se emplean concentraciones mayores 30 g.L⁻¹ de sacarosa en medio Murashige & Skoog (Mohamed et al., 1995; Ramírez, 2013; Goleniowski et al., 2001; Le Guen et al., 2002; Mohamed et al., 1995; Seabrook, 1993; Zel et al., 1997). Entonces, en el ensayo No. 2 se utilizó MS + 5g.L⁻¹ carbón activado + agar 7g.L⁻¹ y tres concentraciones de sacarosa: 50 g.L⁻¹ (ME2a), 70 g.L⁻¹ (ME2b) ó 90 g.L⁻¹ (ME2c). Después de doce semanas en el medio ME2a (50g.L⁻¹ sacarosa) se obtuvo 4 plantas con bulbo de 15 plantas que crecieron a partir de 22 plántulas

sembradas (Figura 5). Los medios ME2b y ME2c no indujeron la formación de bulbo, todas las plantas presentaron desecación de las hojas y las que sobrevivieron con raíz pasaron a la etapa de aclimatación.

Le Guen et al. (2002) observó que GA3 en una concentración 10mM inhibió el crecimiento de la hoja, raíz y la formación de bulbos de chalote. Efecto dado porque las giberelinas (GA3) interactúan con el fitocromo de la célula, regulan varios procesos de crecimiento celular y modifican las orientaciones de los microtúbulos celulares (Mita y Shibaoka, 1984). Por tanto, se suplementó a los medios E4 y E5 con ancymidol, una antigiberelina heterocíclica que inhibe la biosíntesis de GA3 ya que bloquea la conversión de ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico (Rademacher, 2000). Ancymidol combinado con altas concentraciones de sacarosa (hasta 70 g.L⁻¹) estimula el ensanchamiento de la base de las hojas y promueve la rizogénesis (Le Guen et al., 2002). En chalote, el embulbamiento se relaciona con la disminución del 66% en contenido de sacarosa, y el aumento de 188% glucosa, 274% fructosa y 131% de fructanos en la base de las hojas (McCallum et al., 2006).

De todos los carbohidratos no estructurales, los principales componentes de la materia seca del bulbo de la cebolla son los fructanos (Havey et al., 2004). Con el aumento del contenido de sacarosa en el medio se genera un aumento de fructanos en la base de planta. A largo plazo los fructanos se catabolizan durante la regeneración, desarrollan nuevos brotes y promueven la formación de bulbos (Benkeblia et al., 2005). Bulbos de cebolla que contienen mayores concentraciones de fructanos presentan alto peso en seco y son más adecuados para el almacenamiento a largo plazo (Chope et al., 2007). Por lo tanto, la

concentración de carbohidratos en el medio de cultivo y el metabolismo de los fructanos son esenciales para el embulbamiento de la chalote, su calidad y almacenamiento.

Con estos antecedentes, para mejorar el porcentaje de embulbamiento en el ensayo No. 3 se utilizó el medio MS + ancymidol 10uM + NaPO₄ 300 mg.L⁻¹ + agar 7g.L⁻¹ y dos concentraciones de sacarosa 30 g.L⁻¹ (ME3a) ó 50 g.L⁻¹ (ME3b). Con 30 g.L⁻¹ de sacarosa no se observó embulbamiento ni enraizamiento; mientras que con 50 g.L⁻¹ de sacarosa se observó un 76.5% de formación de bulbo y 100% de enraizamiento.

A concentraciones más altas de sacarosa se esperaría mejor respuesta; sin embargo, la cantidad de sacarosa que la planta absorbe y asimila tiene un límite (Zel et al., 1997). Esto se da porque es limitada la producción de las enzimas que interfieren y catalizan el proceso de polimerización de fructanos. Estas enzimas están codificadas por un locus cuantitativo (Quantitative trait locus-QTL), con mayor relevancia la enzima fructosiltransferasa 1-sacarasa-sacarosa (1-SST) (Havey et al., 2004).

Entonces, a pesar de presentar concentraciones de sacarosa mayores en el medio, el proceso de embulbamiento no presenta mejores resultados. Este efecto se corrobora con los resultados del ensayo previo en el que no se observó embulbamiento con las concentraciones 70 y 90 g.L⁻¹ de sacarosa. Entonces, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la concentración óptima de sacarosa para el embulbamiento de cebolla chalote es cercana a 50 g.L⁻¹.

La aclimatación de las plantas del ensayo No. 2 fue efectiva para el 50% (4/8) de plantas del medio ME2a (50g.L⁻¹ sacarosa), 33% (1/3) de plantas del medio ME2b (70g.L⁻¹ sacarosa) y 50% (2/4) plantas del medio ME2c (90g.L⁻¹ sacarosa). Las plantas del ensayo No. 3 se aclimataron correctamente el 50% (11/22) de plantas que provenían del medio

ME3b (50g.L⁻¹ sacarosa). Después de un mes en tierra, las plantas presentaron hojas verdes más grandes, disco basal más grueso y ensanchamiento del bulbo. La pérdida de plantas en este proceso se debió en un 60% por contaminación por hongos y un 40% por desecación. Este resultado se pudo deber a un sistema radicular deficiente y un porcentaje de humedad relativa alto en los primeros días del proceso de aclimatación.

8.2. Determinación de la eficiencia del cultivo de meristemas apicales combinado con termoterapia para la generación de plantas de chalote libres de OYDV

Varios cultivos infectados con virus alrededor del mundo no muestran una sintomatología evidente, por lo que se necesita de métodos de detección más sensibles como RT-PCR (Majumder, 2008; Pannatoni, 2013). En el presente estudio mediante RT-PCR se determinó un 100% de incidencia del virus OYDV en 80 plantas de cebolla chalote tomadas al azar de la Granja Experimental de la USFQ. Este resultado también fue reportado por Ramírez (2013) con muestras de cebolla chalote de la misma localidad y por Oleas (2014) con muestras de otra especie del mismo género (ajo - *Allium sativum*). Estas plantas son originarias de varias localidades del Ecuador lo que indicaría que el virus está diseminado en las zonas productoras de especies de *Allium* y aumenta la necesidad de tomar medidas de limpieza de virus, especialmente tomando en cuenta que el cultivo se propaga vegetativamente con la tendencia de incrementar la carga viral con el paso de las generaciones (Shiboleth et al., 2006).

En este estudio se realizó el aislamiento y el cultivo in vitro de meristemas como método de erradicación del virus OYDV con el que se obtuvo un 37% de éxito. Este porcentaje es más alto que el obtenido en estudios donde se reportan porcentajes de eficiencia de erradicación de OYDV entre 17% y 29% (Conci y Nome, 1991; Ramírez, 2013). Cabe recalcar que la

eficiencia de la propagación de plantas libres de virus es directamente dependiente del tipo de cultivo utilizado (Shiboleth et al., 2001; Ucman et al., 1998).

El limitado éxito de eliminación de virus por cultivo de meristemas se debe quizá a que el aislamiento de tejido meristemático es una técnica manual no automatizada y el meristema necesita de un número mínimo de células diferenciadas yuxtapuestas que fomenten su desarrollo. Estas presentan comunicación activa y plasmodesmos siendo por tanto proclives al ingreso de virus, constituyéndose así en fuente de contaminación para las nuevas células que se diferencian a partir del meristema (Randillac y Teysseidier, 1992).

Para evitar la infección de las células nuevas se empleó termoterapia que consiste en someter a los meristemas a 35 °C durante 4 días, con la cual se elevó el porcentaje de eliminación de OYDV al 55%. Otras publicaciones presentan porcentajes que varían entre 50% y 81% con el uso de termoterapia (Almaarri et al., 2011; Díaz et al., 2007; Torres et al., 2000; Su Chuang y Wu-Shann, 1994; Conci y Nome, 1991). En *Allium sativum* se reporta 51% de eliminación de los virus GYSV, OYDV y CLV (Conci y Nome, 1991), y 77% cuando se eliminan OYDV y SLV (Torres et al., 2000). En *Allium fistulosum* L. Su Chuang y Wu-Shann (1994) reportan 50% de eliminación de SLV. En otros cultivos en los cuales se ha aplicado cultivo de meristemas y termoterapia para erradicación viral se reporta máximo un 81% de PYV (Potyvirus Y virus) en papa (Almaarri et al., 2011) y 70% para GLRaV-1 en uvas (Díaz et al., 2007). El efecto positivo de la termoterapia estaría asociado con la incapacidad de los virus para ensamblar correctamente sus proteínas de la cápside, con lo cual a temperaturas elevadas se degradan y no pueden infectar a células sanas (Díaz et al., 2007).

No obstante, como se puede observar en la Figura 10, el porcentaje de regeneración de plantas a partir de meristemas apicales decayó en un 23.8% cuando se sometieron a termoterapia y su crecimiento estuvo comprometido observándose valores más bajos que los meristemas apicales sin termoterapia. Este fenómeno es congruente con otros estudios debido a que la alta temperatura no solo afecta al virus sino también a la planta, pues muchos procesos enzimáticos pueden limitarse ya que tienen una temperatura óptima para su correcto funcionamiento. Además, la tasa de deshidratación de las plantas es más alta y no hay un flujo de nutrientes estable (Conci y Nome, 1991).

Para mejorar los porcentajes de eliminación de virus en varios estudios se han combinado tres métodos: extracción de meristemas, quimioterapia y termoterapia. Cuando se acoplan las tres metodologías se obtiene incluso el 100% de eficiencia; por ejemplo en *Allium sativum* para OYDV, GYSV y CLV y en *Allium fistulosm* L. para SLV (Almaarri et al., 2011; Conci y Nome, 1991; Su Chuang y Wu-Shann, 1994). Por lo tanto, se recomienda que en próximos estudios se combinen las tres metodologías para mejorar las eficiencias de limpieza de virus en cebolla chalote.

9. Conclusiones

- Se determinó que 4 semanas de frío es más efectivo que 2 semanas de frío para ruptura de dormancia, pues se encontró un 44% de regeneración con 2 semanas de frío y 78% con 4 semanas de frío.
- Se observó que el medio MS + sacarosa 30 g.L⁻¹, benomyl 1,5g.L⁻¹ + agar 7g.L⁻¹ con la concentración hormonal C2 (1.1 uM NAA + 8.9 uM BAP) fue el más eficiente para la regeneración de plantas a partir del meristema apical.
- Se obtuvo un 76% de embudamiento y 100% enraizamiento mediante el uso del medio de embudamiento ME3b: MS + 10uM ancymidol + 300 mg.L⁻¹ NaPO₄ + agar 7g.L⁻¹ y 50 g.L⁻¹ sacarosa.
- Se obtuvo un 50% de aclimatación efectiva; es decir 11/22 plántulas mantuvieron un crecimiento y engrosamiento constante después de 15 semanas en tierra.
- Se detectó el 100% de incidencia del virus del enanismo amarillo (OYDV) en plantas de chalote de la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito.
- Se obtuvo un 37% de eficiencia en la eliminación de virus OYDV mediante el cultivo de meristemas.
- Se aumentó a 55% la eficiencia en la eliminación viral OYDV mediante el cultivo de meristemas en combinación con termoterapia.
- La termoterapia redujo un 23.8% el porcentaje de regeneración de plantas a partir de los meristemas apicales.

10. Recomendaciones

- Utilizar el protocolo estandarizado de regeneración de chalote a partir de meristemas apicales en ensayos con termoterapia.
- Probar el cultivo de meristemas combinado con termoterapia y quimioterapia para aumentar el porcentaje de limpieza de virus.
- Realizar la detección viral mediante RT-PCR multiplex para la identificación no solo de OYDV sino también de otros virus patógenos como SLV y LYSV.
- Realizar RT-PCR con primers de la región 28S del RNA ribosomal que sirva como control de calidad del RNA total.

11. Bibliografía

- Abdelnour, A. Bermudez, L. Alvarenga, S. Rivera, C. (2006) *Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (Sechium edule Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV)*. Manejo de Plagas y Agroecología. 77. 17-23
- Almaarri, K. Massa, R. Albisky, F. (2012) *Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate potato Y potyvirus from infected potato plants*. Plant Biotechnology 29.237-243.
- Arifin, N.; Ozaki, Y.; Okubo, H. (2000) *Genetic diversity in Indonesian shallot (Allium cepa var. ascalonicum) and Allium wakegi revealed by RAPD markers and origin of A. wakegi identified by RFLP analyses of amplified chloroplast genes*. Kluwer Academic Publisher. Holanda. Euphytica 111: 23–31
- Bagi, F.; Stojšin, V.; Budakov, D.; Moh, S.; El Swaeh, A.; Gvozdanović-Varga, J. (2012) *Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic (Allium sativum L.) in Serbia*. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(15), pp. 2386-2390
- BCE. (2014). Banco Central del Ecuador. *Encuestas de Coyuntura Sector Agropecuario*. 86. 1-52.
- Benkeblia, N. N. (2003). *Low Temperature and Breaking of Dormancy Effects on Respiration Rate, Sugars, Phenolics and Peroxidase Activity Changes in Inner Buds of Onion Allium cepa L*. Taylor & Francis Group. 16-20.
- Benkeblia, N. Ueno, K. Onodera, S. & Shiomi, N. (2005) *Variation of fructooligosaccharides and their metabolizing enzymes in onion bulb during long-term storage*. Journal of Food Science 70.208-213.
- Blanc, S. (2008). *Vector transmission of plant viruses*. In B. Mahy, & M. Regenmortel, Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology (pp. 10-18). Elsevier, Academic Press.
- Bos, L.; Huttinga, H.; Maat, D. (1978) *Shallot latent virus, a new carlavirus*. Netherlands Journal of Plant Pathology Volume 84, Issue 6, pp 227-237.

- Bufler, G. (2009) *Exogenous ethylene inhibits sprout growth in onion bulbs*. *Annals of Botany*, 103:23-28.
- Caldes, G.; Prescott, B. (1973) *A potencial antileukemic substace present in Allium ascalonicum*. *Planta Medica* 23, 99-100
- Chen, J., Adams, M., Zheng, H., & Chen, J. (2003). *Sequence analysis demonstrates that Onion yellow dwarf virus isolates from China contain a P3 region much larger than other potyvirus*. *Archives of Virology*, 148, 1165–1173.
- Chen, J., Chen, J., & Adams, M. (2001). *Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China*. *Archives of Virology*, 146, 1841-1853.
- Chope, G. Terry, L. White, P. (2007) *The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the physical and biochemical characteristics of onion cv. SSI bulbs during storage*. *Postharvest Biology and Technology*. 44: 131-140
- Citovsky, V., & Zambryski, P. (2005). *How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections?* *BioEssays*, 13(8), 373-379.
- 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
- Conci, V.; Canavelli, A.; Lunello, P. (2003) *Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years*. *Plant Dis*. 87:1411-1415.
- Currah, L.; Proctor, F. (1990) *Onions in Tropical Regions*. *Bulletin* 35, Natural Resources Institute, Chatham Maritime, Kent, UK 232.
- Dankert, J.; Tromp, T.; de Vries, H.; Klasen, H. (1979) *Antimicrobial activity of crude juices of Allium ascalonicum, Allium cepa and Allium sativum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Paraxitenkunde, Infektion skrankheiten and Hygiene* 245, 229-239.
- Di Laurenzio L.; Wysocka-Diller J.; Malamy JE.; Pysh L.; Helariutta Y.; Freshour G.; Hahn MG.; Feldmann KA.; Benfey PN. (1996) *The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root*. *Cell*: 86(3):423-33. 40

- Díaz, A. Norton, M. Martínez, R. Uchanski, M. Mulwa, R. Skirvin, R. (2007) *The use of thermotherapy and in vitro meristem culture to produce virus-free 'Chancellor' grapevines*. International Journal of Fruit Science. 7:15-25
- Diekmann, M. Ed. (1997) *Allium spp.* FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germoplasm No. 18.
- Dovas, C., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y., & Katis, N. (2001). *Comparison of Methods for Virus Detection in Allium spp.* Journal of Phytopathology, 149, 731-737.
- Edwards, K.; Humphry, M.; Sanchez-Tamburrino, J. (2012) *Advances in Plant Senescence*. Senescence: 117-136.
- Elnagar, S.; El-Sheik, M.; Abdel Wahab, (2009) *Effect of natural infection with onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt*. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture: 34-39
- EPPO (2001) *Allium crops. Guidelines on good plant protection practice*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Boletín 31. 211-230
- Fletcher, P.; Fletcher, J.; Lewthwaite, S. (1998) *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.
- Fritsch, R.; Friesen, N. (2002) *Evolution, Domestication and Taxonomy*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition. CABI.
- Galmarini, C. (1997) *Allium crop situation in Argentina*. Acta Horticulturae 433.35-52.
- Goleniowski, M. Del Longo, O. De Forchetti, S. Arguello, J. (2001) *Relationships between peroxidases and in vitro bulbification in garlic (Allium sativum L.)* In vitro cellular and Development Biology. 37: 638-686
- Grout, B (1990) *Meristem-tip culture*. Plymouth Polytechnic. Methods Molecular Biology. 51.161-166
- Grubben, G. (1994) *Constraints for shallot, garlic and welsh onion in Indonesia: a case study on the evolution of allium crops in the equatorial tropics*. Acta Horticulturae 358, 333-339.

- Havey, M. J., Galmarini, C. R., Gökçe, A., & Henson, C. (2004). *QTL affecting soluble carbohydrate concentrations in stored onion bulbs and their association with flavor and health-enhancing attributes*. Genome Vol. 47: 463-468
- Hull, R. (2001). *Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV*. Archives of Virology, 146(11), 2255–2261.
- James, D., Varga, A., Pallas, V., & Candresse, T. (2006). *Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses*. Canadian Journal of Plant Pathology, 28(1), 16-29.
- Jones, H.; Mann, L. (1963) *Onions and their allies*. Botany, cultivation, and utilization. Interscience Publishers, New York, 286.
- Kahane, R. Randillac, M. & Teyssendier, B. (1991) *Long-term multiplication of onion (Allium cepa L.) by cyclic shoot regeneration in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 28.281-288.
- Kassachau, K.; Xie, Z.; Allen, E.; Llave, C.; Chapman, E.; Krizan, K.; Carrington, C. (2003) *PI/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function*. Developmental Cell: 4, 205–217.
- Koch, M., Ta'anami, Z., & Salomon, R. (1995). *Improved regeneration of shoots from garlic callus*. Horticultural Science, 30, 378.
- Lapitan, V. Pateña, L. Rosario, T. *In vitro system of producing chalote planting material. Philippines*. Journal of Crop Science 16(3), 95-101. 1991
- Lazarowitz, S. Beachy, R. (1999) *Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants*. The plant cell. 11: 535-548
- Le Guen S. Hourmant, A. Esnault, F. & Chauvin, J. (2002). *In vitro Bulb Development in Shallot Effects of Anti-gibberellins, Sucrose and Light*. Annals of Botany 89. 419-425
- Loebenstein, G. (2008). *Plant Virus Diseases: Economic Aspects*. In B. Mahy, & M. Regenmortel, Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology (pp. 426-30). Elsevier, Academic Press.

- Lot, H.; Chovelon, V.; Souche, S.; Delecolle, B. (1998) *Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars*. The American Phytopathological Society. Plant Disease: 1381-1395
- Ma Z, Hu X, Cai W, Huang W, Zhou X, et al. (2014) *Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions*. PLoS Genet 10(8)
- 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 Euroasian Journal of Agriculture and Environment, Vol. 6: 746-755. 41
- 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.
- McCallum, J. Clarke, A. Pither, M. Shaw, M. Butler, R. Brash, D. Scheffer, J. Sims, I. Brash, D. Heusden, S. Shigyo, M. Havey. M. (2006) *Genetic mapping of a mayor gene affecting onion bulb fructan content*. Theory Apply Genetics. 112: 958-967
- Messiaen, C.; Lot, H.; Delecolle, B. (1994) *Thirty years of France's experience in the production of disease-free garlic and shallot mother bulbs*. Acta Horticulturae 358, 275-279.
- Minitab (2014) Minitab Quality Companion. Statistical Software. Disponible en: <<http://www.minitab.com>> Acceso: 2014.
- Mita T, Shibaoka H. (1984). *Gibberellin stabilizes microtubules in onion leaf sheath cells*. Protoplasma 119: 100-109.
- Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S.; Splittsotoesser, W. (1995) *In vitro bulb production from Allium spp*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31:51-52. 1995
- Oleas, A. (2014) *Simultaneous RT-PCR detection of 3 viruses infecting garlic (Allium sativum L.) crops in Ecuador and in vitro production of virus-free bulblets*. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito.

- Panattoni, A. Luvisi, A. Triolo, E. (2013) *Review: Elimination of viruses on plants: twenty years of progress*. Spanish Journal of Agricultural Research. 11: 173-188
- Rabinowitch H. Kamenetsky, R. (2002) *Shallot (Allium cepa, aggregatum group)*. Allium Crop Science. Institute of Plant Science and Genetics in agriculture. 17: 409-430
- Rademacher, W. (2000) *Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways*. BASF Agricultural Center. Plant Physiol. 51: 501-531
- 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.
- Rancillac, M.; Teyssendier, B. (1992) *Long-term multiplication of onion (Allium cepa L.) by cyclic shoot regeneration in vitro*. France, 1992; Plant Cell and Organ Culture, Vol. 28: 281-288.
- Randle, W.; Lancaster, J. (2002) *Sulphur Compounds in Alliums in relation to flavor quality*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition. CABI.
- Rees, D. Farrell, G. Orchard, J. (2012) *Crop Post-Harvest: Science and technology, perishables*. Pg: 371.
- Regenmortel, V. (2008). *The nature of viruses*. In B. Mahy, & M. Regenmortel, Desk Encyclopedia of General Virology (pp. 19-23). Elsevier, Academic Press.
- Roberts, A. (2005). *Plasmodesmal structure and development*. In K. Oparka, Plasmodesmata (pp. 1-21). Blackwell Publishing.
- Robledo-Paz, A. Villalobos, M. & Alba, J (2000) *Efficient Plant Regeneration of Garlic (Allium sativum L.) by Root-Tip Culture*. In Vitro Cell 36.416-419.
- Roca, J. (1984) *El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro*. Libro. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 8-10
- Salomon, R. (2002) *Virus Diseases in garlic and the propagation of virus-free plants*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition. CABI, 2002.

- Salomon, R.; Koch, M.; Levy, S.; Gal-On, A. (1996) *Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic*. Symposium Proceedings No. 65: Diagnostics in Crop Production. Reino Unido pp 193-198.
- Seabrook (1993) *In vitro propagation and bulb formation of garlic*. *Canadian Journal of Plant Science*. 155-158
- Shakuntala, N. Gunnar, F. Tage, E. (1977) *Effects of 6-(3-methyl-2-buten-1-ylamino)-purine and α -naphthaleneacetic acid on root formation and cytology of root tips and callus in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum**. Institute of Physiological Botany, Sweden. *Hereditas*.85: 57-62
- Shiboleth, Y., Gal-On, A., Koch, M., Rabinowitch, H., & Salomon, 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.
- Shiboleth, Y.; Gal-On, A.; Koch, M.; Rabinowitch, H.; Salomon, R. (2006) *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. 2006 42
- SINAGAP (Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca) (2013). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. [consultado: 01/08/2014] <<http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/>>
- Stearn, W. (1992) *How many species of Allium are known?*. *Curtis's Botanical Magazine* 9: 180-182.
- 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.
- Sutic, D., Ford, R., & Tomic, M. (1999). *Onion yellow dwarf virus*. In *Handbook of Plant Virus Diseases* (pp. 158-9). CRC Press.
- Takaki, F.; Sano, T.; Yamashita, K. (2006). *The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro*. *Archives of Virology* 151: 1439-1445

- Tappayuthpijarn, P.; Dejatiwongse, Q.; Hincheraan, T.; Suriyant, P. (1989) *Effect of Allium ascalonicum on erythrocyte shape in induced hypercholesterolemia rabbits*. Journal of the Medical Association of Thailand 72, 448-451
- Torres, C. Vinicius, T. Nepomuceno, A. & de Oliveira, R. (2000) *Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic*. Horticulturae Bras 18. 192-199
- Tsuneyoshi, T., Matsumi, T., Natsuaki, K., & Sumi, S. (1998). *Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in Allium plants*. Archives of Virology, 143, 97-113.
- Ucman, R., Zel, J., & Ravnkar, M. (1998). *Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro*. Scientia Horticulturae, 73, 193-202.
- Verbeek, M., Van Dijk, P., & Van Well, P. (1995). *Efficiency of eradication of four viruses from garlic (Allium sativum) by meristem tip-culture*. European Journal of Plant Pathology, 101, 231-239.
- Walkey, D. *Virus diseases*. (2002) In: Radinowitch. H.D. and Brewster, J. (eds) Onions and Allied Crops, Vol II. Agronomy, Biotic Interactions, Pathology and Crop Protection. CRC Press, Florida, 191-212
- Xu, Z. Um, Y. Chun, Kim, Gang, Lu. De-Ping, G. Hai-Lin, L. Amadou, A. Aining, M. (2008) *Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of chinese jiaotou (Allium chinense) and in vitro bulblet formation*. Acta Physiol Plant. 30: 521-528
- Zel, J. Debeljak, N. Ucman, R. Ravnkar, M. (1997) *The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (Allium sativum L.) cv. Ptujski Jesenski bulb formation in vitro*. In vitro cellular and developmental biology. 33: 231-235
- Zheng, S. Henken, B. Sofiari, E. Keizer, P. Jacobsen, E. Kik, C. Krens, F. (1999) *Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures of Allium cepa L.* Euphytica. 108: 83-90

12. Tablas

Tabla 1: Resumen de los tres ensayos realizados para la estandarización del cultivo in vitro de chalote (#plantas vivas/# plantas sembradas)

Ensayo	Brotación discos basales	Regeneración de plántulas a partir de meristema apical	Enraizamiento	Embulbamiento			Aclimatación			
1	Medio:	MI+C1	MI+C1	MS	ME1					
	2 semanas de frío	25/25	10/25	6/10	1/6			NA		
	4 semanas de frío	25/25	19/25	14/19	1/14			NA		
	Medio:	MI+C2	MI+C2	MS	ME1					
	2 semanas de frío	25/25	12/25	8/12	2/8			NA		
	4 semanas de frío	25/25	20/25	15/20	3/15			NA		
2	Medio:	MI+C1	MI+C1	MS	ME2a	ME2b	ME2c	ME2a*	ME2b*	ME2c*
	4 semanas de frío	75/75	43/75	32/43	7/10	5/11	4/11	1/3	0/1	0/1
	Medio:	MI+C2	MI+C2	MS	ME2a	ME2b	ME2c	ME2a*	ME2b*	ME2c*
	4 semanas de frío	75/75	46/75	36/46	8/12	4/12	4/12	3/5	1/2	2/3
3	Medio:	MI+C2	MI+C2	ME3a		ME3b		ME3a*		ME3b*
	4 semanas de frío	100/100	68/100	12/34		22/34		0/12		11/22

*Medio de embulbamiento utilizado previamente a la aclimatación.

MI: MS + sacarosa 30 g.L⁻¹ + benomyl 1,5g.L⁻¹ + agar 7g.L⁻¹; **MI+C1:** 5 uM NAA+ 5uM BAP; **MI+ C2:**1,1uM NAA+ 8,9uM BAP

ME1: MS + 60g.L⁻¹ sacarosa + 5g.L⁻¹ carbón activado + agar 7g.L⁻¹

ME2: MS+5g.L⁻¹ carbón activado + agar 7g.L⁻¹; **ME2a:** 50g.L⁻¹ sacarosa; **ME2b:** 70g.L⁻¹ sacarosa; **ME2c:** 90 g.L⁻¹ sacarosa

ME3: MS+10uM ancymidol+300 mg.L⁻¹ NaPO₄ + agar 7g.L⁻¹; **ME3a:** 30g.L⁻¹ sacarosa; **ME3b:** 50g.L⁻¹ sacarosa

NA: No aclimatables

13. Figuras

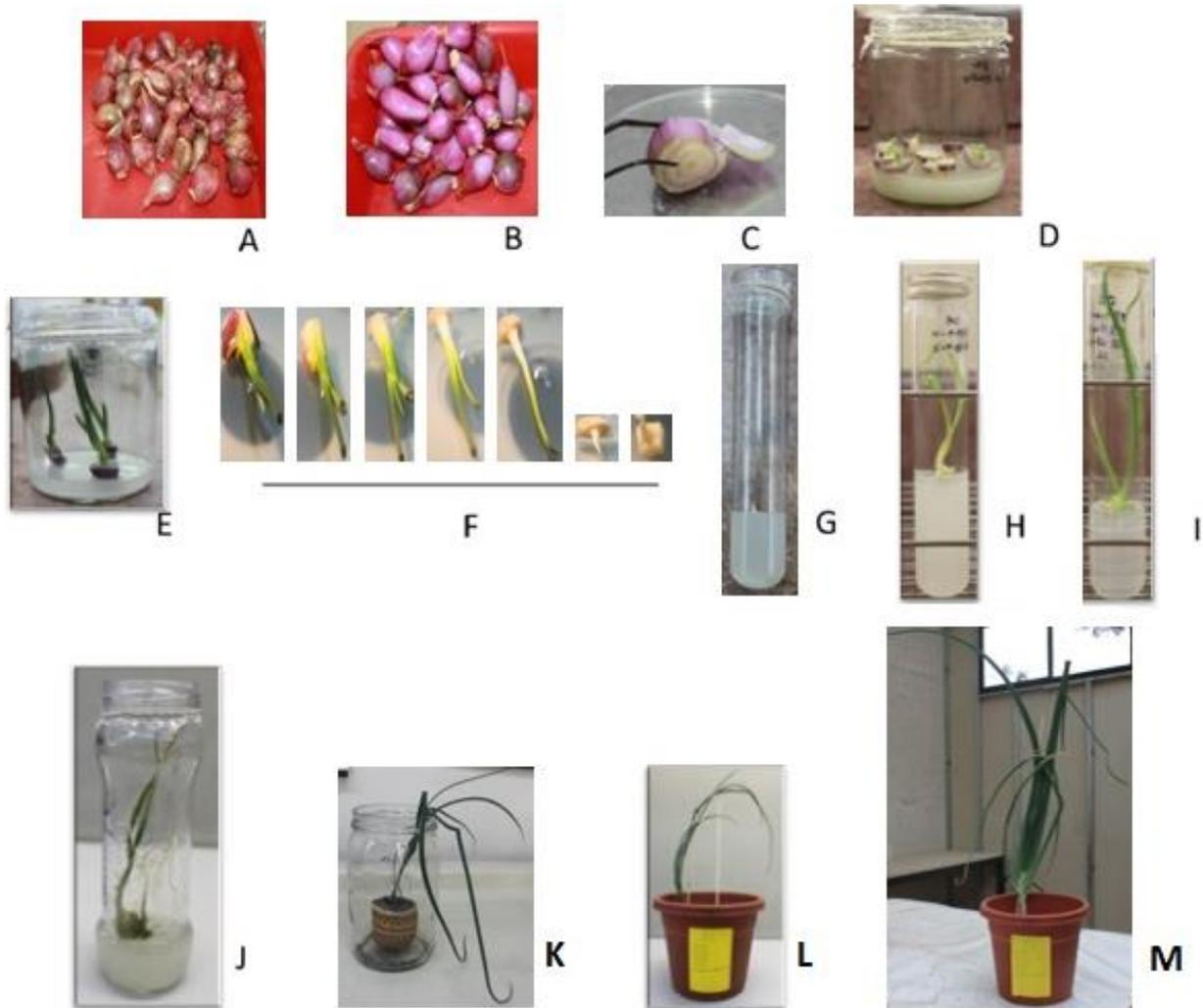


Figura 1: Esquema del proceso de regeneración de plántulas de chalote a partir de cultivo de meristemas apicales.

A. Bulbos previo al cultivo in vitro. **B.** Bulbos luego de la limpieza con agua corriente y descarte de las hojas externas secas, y cortado a un tercio de su longitud. **C.** Bulbo luego del proceso de desinfección hasta obtener un explante de 1.5 cm de diámetro y 1 cm de alto. **D.** Discos basales en medio de inducción (día cero). **E.** Discos basales en medio de inducción listos para extracción de meristemas apicales. **F.** Eliminación sistemática de los catófilos más externos hasta dejar el disco basal acompañado del meristema apical rodeado de dos catófilos. **G.** Meristema apical en medio de regeneración (día cero). **H.** Plántula regenerada en medio de regeneración después de cuatro semanas. **I.** Plántula en medio de crecimiento (sin hormonas) después de cuatro semanas. **J.** Plántula en medio de embulbamiento después de doce semanas. **K.** Planta en maceta de barro luego de 4 semanas de su aclimatación. **L.** Planta en maceta plástica luego de 8 semanas de su aclimatación. **M.** Planta aclimatada luego de 15 semanas.

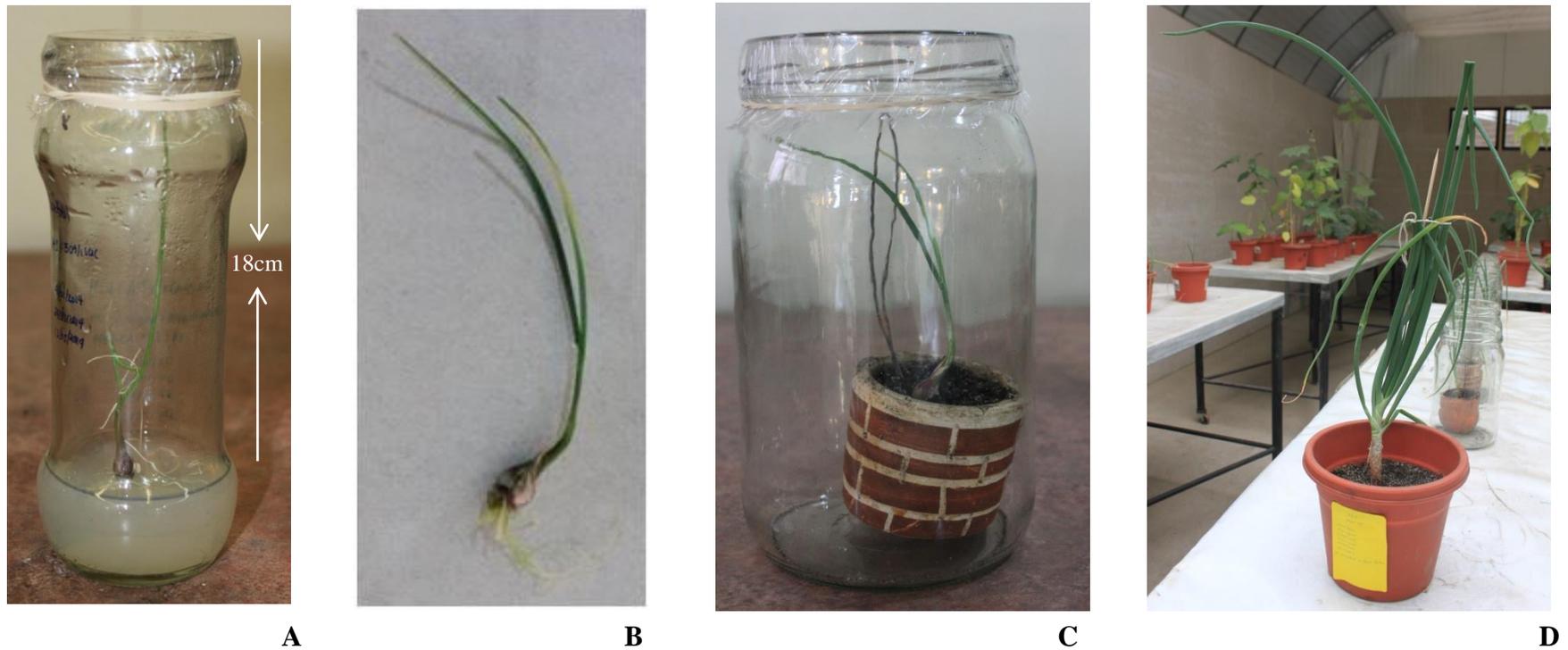


Figura 2: Esquema del proceso de aclimatación de plantas de chalote

A. Plántula en medio de embulbamiento después de doce semanas. **B.** Planta lista para ser aclimatada. **C.** Planta en maceta de cerámica con tierra de la Granja Experimental de la USFQ en el primer día de aclimatación. **D.** Planta aclimatada después de 15 meses en el invernadero de la USFQ.

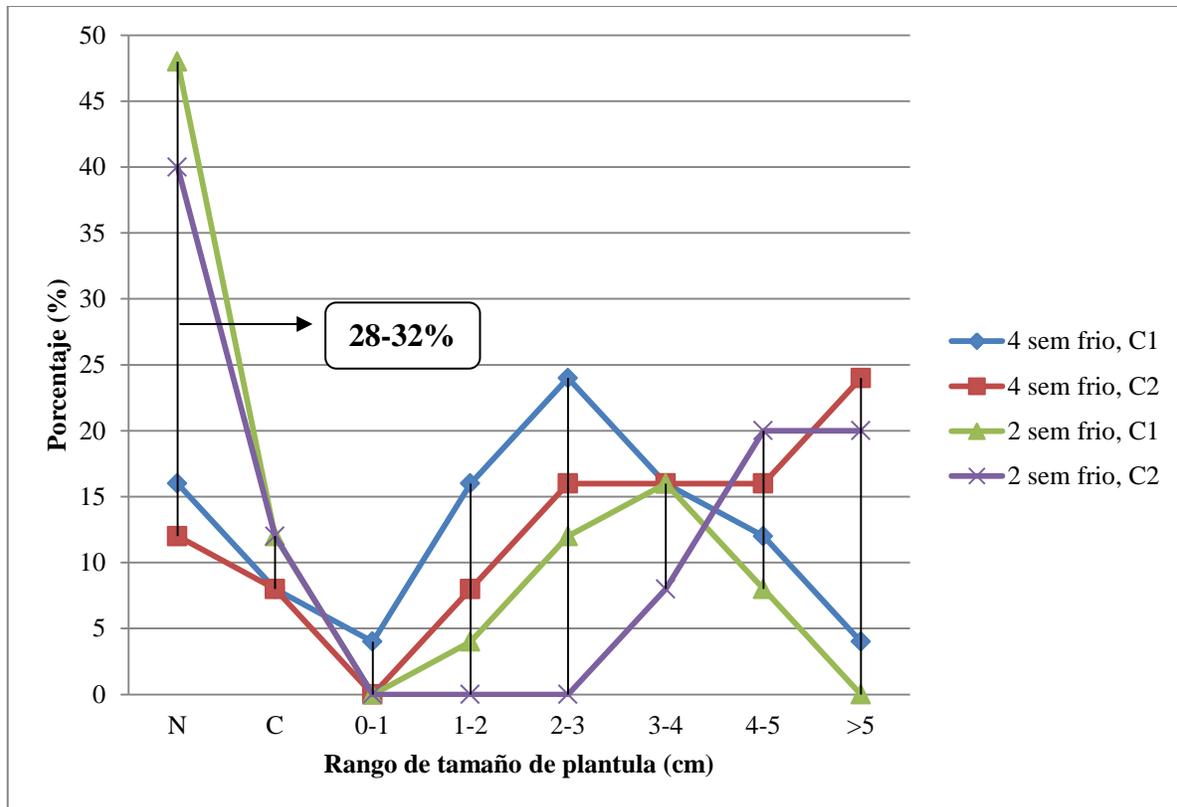


Figura 3: Efecto del tiempo de frío en la ruptura de dormancia y la regeneración de plántulas de chalote a partir de meristemas apicales.

N: No regeneración; **C:** Contaminación; **C1:** 5 uM NAA + 5 uM BAP; **C2:** 1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP

Se observa un aumento en el porcentaje de regeneración del 28-32% para las plántulas que recibieron cuatro semanas de frío para ruptura de dormancia respecto del obtenido con 2 semanas de frío. El porcentaje de contaminación se mantuvo en $12 \pm 3\%$ en todos los ensayos. Del porcentaje de plántulas regeneradas, se observa rangos de tamaño más altos para la concentración C2.

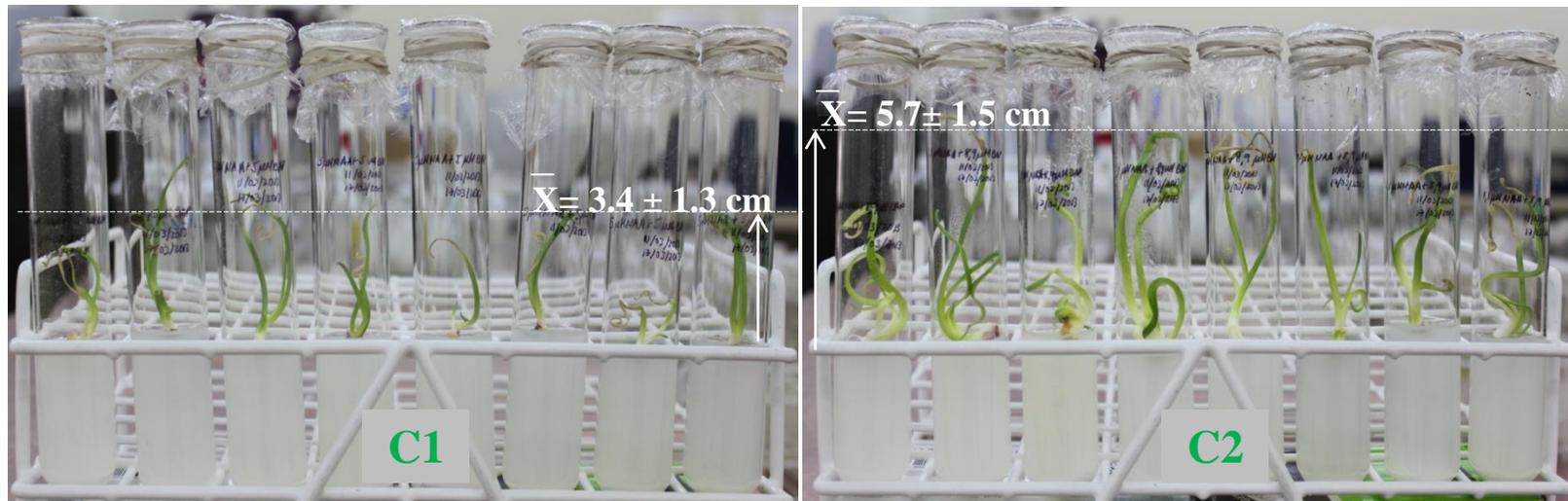


Figura 4: Comparación del tamaño de las plántulas regeneradas en las dos combinaciones de hormonas suplementadas en medio de inducción a las 4 semanas luego de la siembra de meristemas.

C1: 5 uM NAA + 5 uM BAP; **C2:** 1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP.

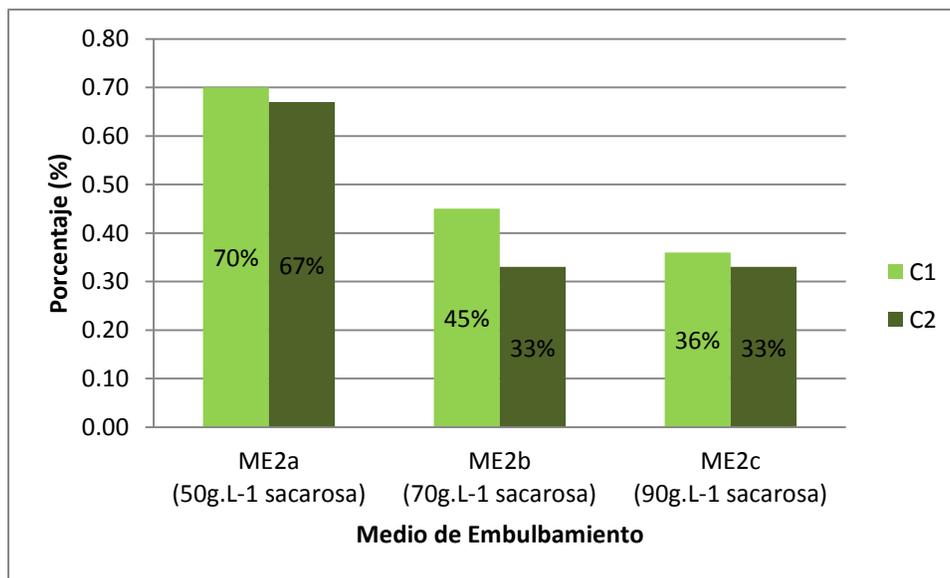


Figura 5: Comparación de la concentración de sacarosa en el crecimiento de plántulas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales en medio de embudamiento en el ensayo No 2.

C1: MS+5uM NAA + 5uM BAP; **C2:**1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP.

El medio con una tasa de crecimiento mayor fue ME2a (15/22); mientras que el medio con una menor tasa de crecimiento fue ME2c (8/23). No se observa diferencias significativas entre las concentraciones de hormonas C1 y C2.

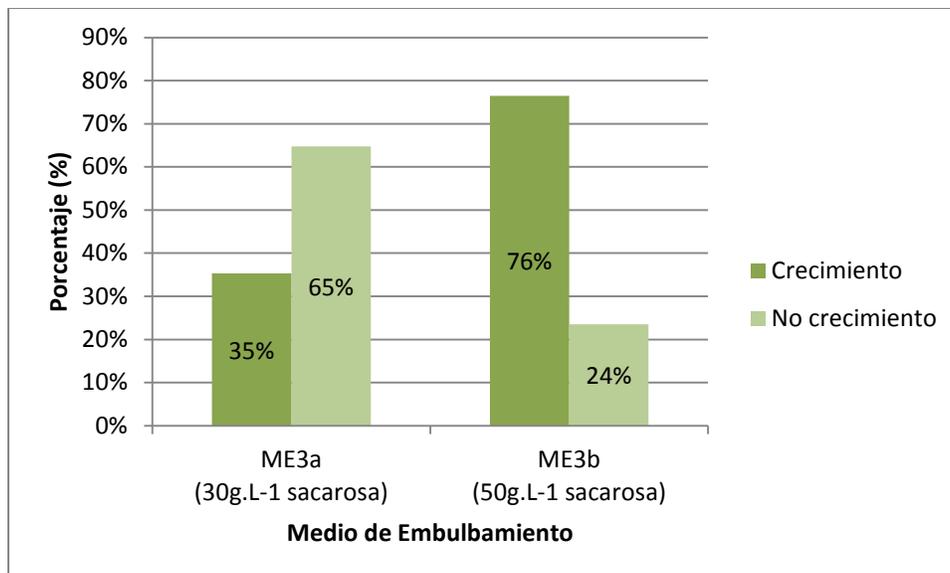


Figura 6: Efecto de la concentración de sacarosa para el ensayo No. 3 con ancymidol en el crecimiento de plántulas regeneradas a partir de meristemas apicales.

En el medio ME3a después de quince semanas sólo 12/34 (35%) plántulas presentaron crecimiento, ninguna presentó bulbillo ni raíces; mientras que en el medio ME3b 22/34 (65%) plántulas crecieron, 17 desarrollaron bulbillo y todas presentaron raíces.



50 g.L⁻¹ sacarosa

30 g.L⁻¹ sacarosa

Figura 7: Comparación de los efectos de la concentración de sacarosa suplementada en medio de embudamiento con ancymidol, en la formación de bulbos en chalote.

Las plántulas regeneradas en medio de embudamiento presentaron un promedio de crecimiento de 4 ± 0.7 cm en el medio ME3a y un promedio de 12.54 ± 2.49 cm en el medio ME3b después de ocho semanas.

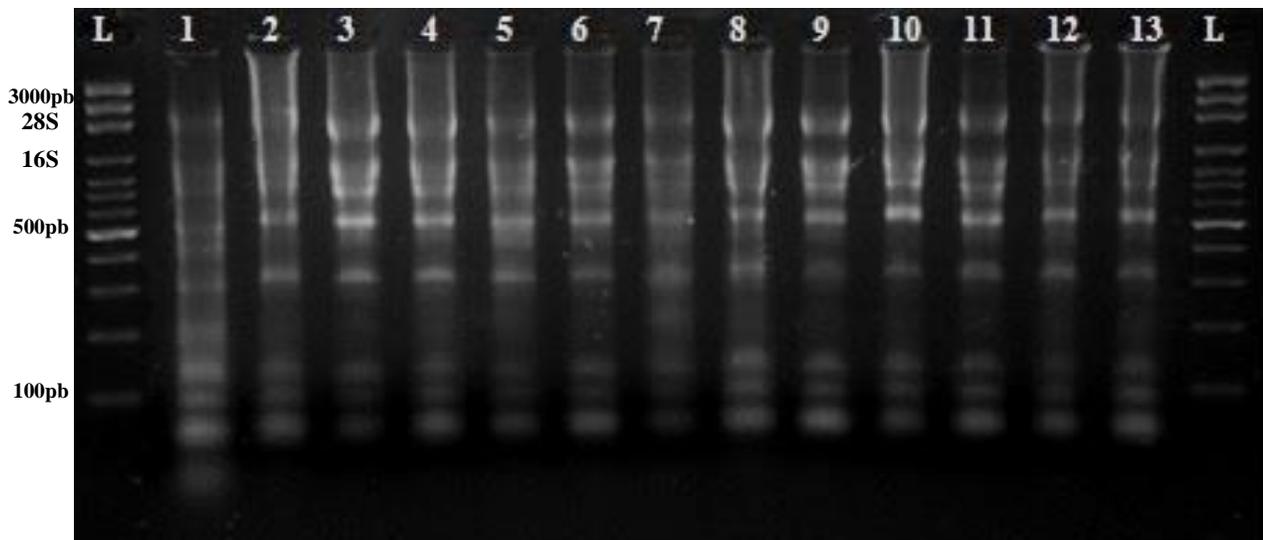


Figura 8: ARN total extraído de 13 muestras de hojas de chalote. Gel de agarosa 1.5%. L: Ladder 100bp (Invitrogen); 1-13: Muestras de ARN de chalote.

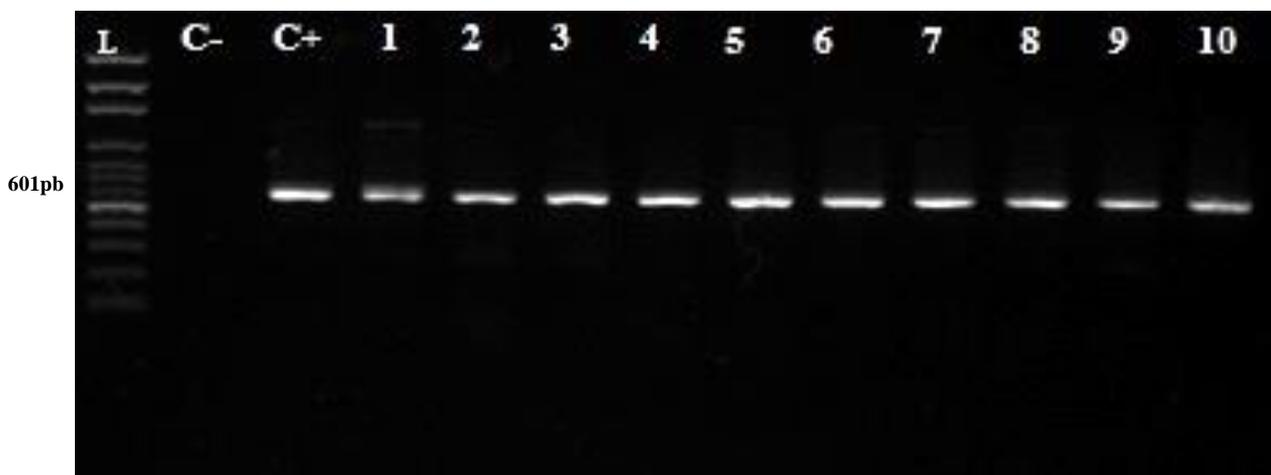


Figura 9. Detección de OYDV de chalote previo al proceso de limpieza de virus.

Gel de agarosa 1.5%. L: Ladder 100bp (Invitrogen); C-: Control negativo; C+: Control positivo; 1-10: amplificación de 10 muestras de ADNc del virus OYDV a partir de ARN total extraído de hojas de plantas de chalote.

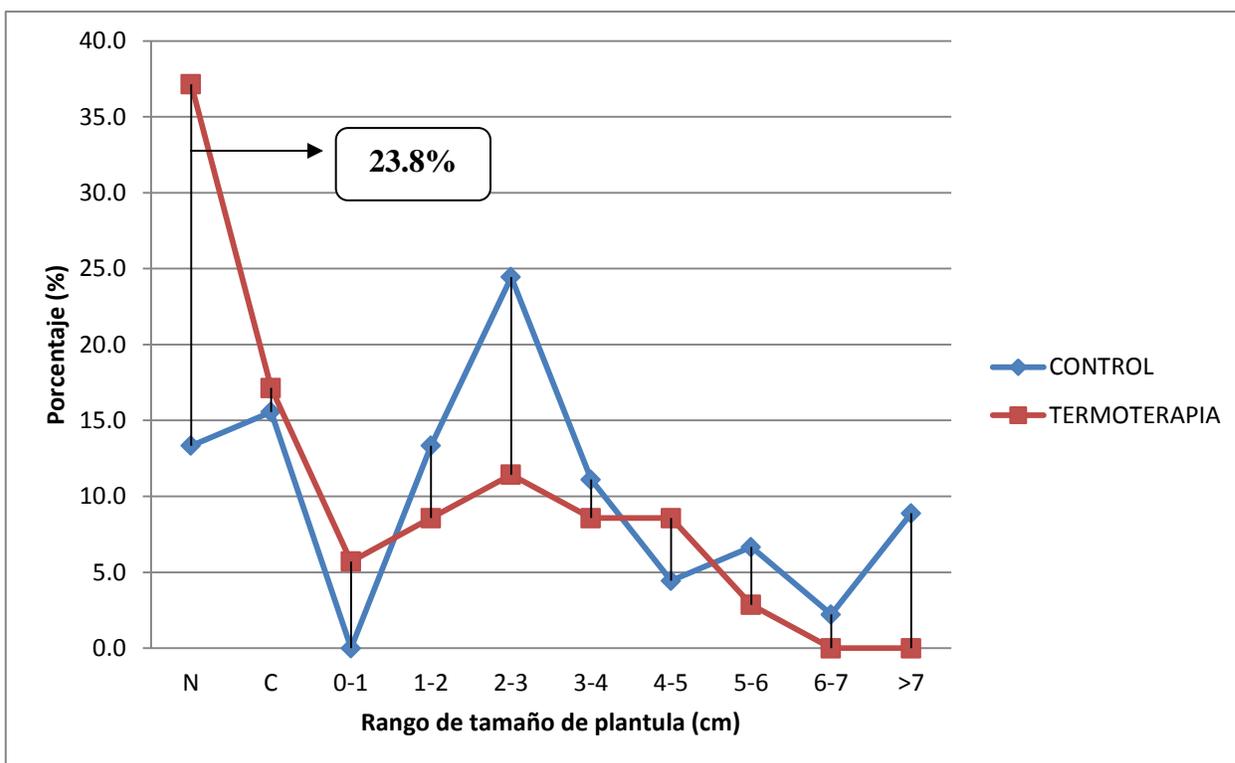


Figura 10: Efecto de la termoterapia en la regeneración de plántulas de chalote a partir de meristemas apicales. **N:** No regeneración; **C:** Contaminación

El porcentaje de regeneración de plantas regeneradas a partir de meristemas apicales con la aplicación de termoterapia decayó en un 23.8% en comparación con el control

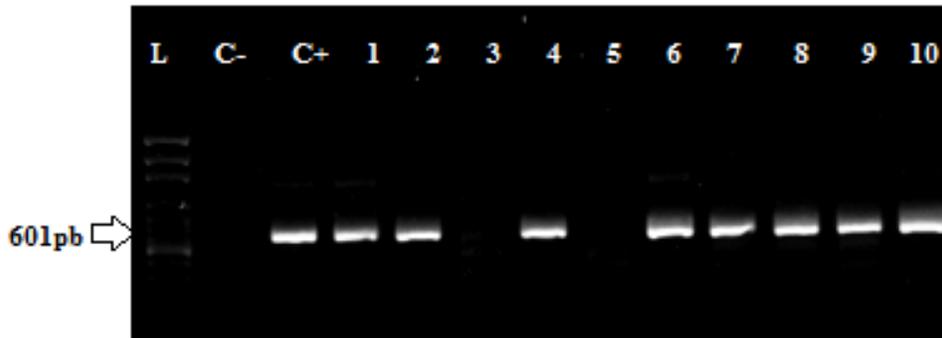


Figura 11: Detección de OYDV de chalote posterior al proceso de limpieza de virus mediante cultivo de meristemas apicales.

Gel de agarosa 1.5%. L: Ladder 100bp (Invitrogen); C-: Control negativo; C+: Control positivo; 1-10: amplificación de 10 muestras de ADNc del virus OYDV a partir de ARN total extraído de hojas de plantas de chalote.

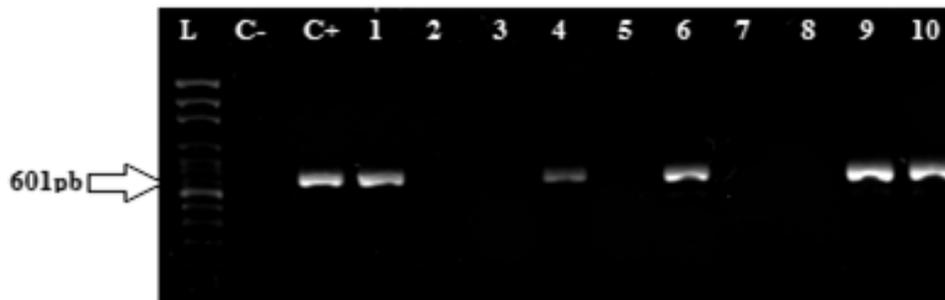


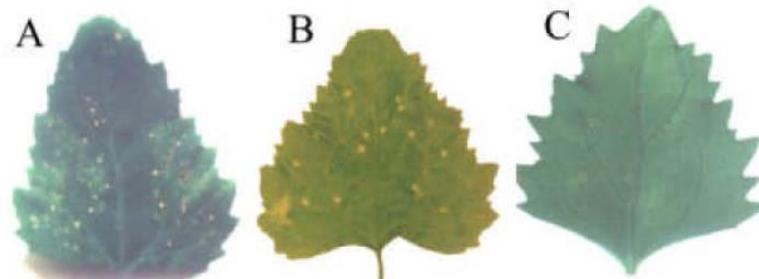
Figura 12. Detección de OYDV de chalote posterior al proceso de limpieza de virus mediante cultivo de meristemas apicales y tratamiento con termoterapia.

Gel de agarosa 1.5%. L: Ladder 100bp (Invitrogen); C-: Control negativo; C+: Control positivo; 1-10: amplificación de 10 muestras de ADNc del virus OYDV a partir de ARN total extraído de hojas de plantas de chalote

14. Anexos

Anexo 1: Síntomas de OYDV en plantas indicadoras (A) y micrografía electrónica de virus OYDV (B) (Tomado de Mahmoud et al. 2007).

A: Lesiones locales por inoculación con savia de ajo infestado con OYDV en *C. amaranticolor* (A) después de la exposición a 60°C por 10 min en *C. amaranticolor* (B) y *C. quinoa* (C)



B: Micrografía electrónica de OYDV con acetato de uranil al 2% (aumento: 60 000x)



Anexo 2: Cuantificaciones ARN total extraído de hojas de cebolla chalote regeneradas a partir de cultivo de meristemas apicales (Control)

	N°	Concentración (ng/uL)	A 260/280	A 260/230
CONTROL	1	279.7	1.9	1.34
	2	562	1.96	1.1
	3	1131.3	2	1.49
	4	578.5	1.97	1.5
	5	1904.5	2.02	2.02
	6	631.2	1.98	1.67
	7	271	1.97	1.3
	8	365.8	2.05	1.17
	9	196.9	1.72	1.04
	10	798.6	1.96	1.36
	11	1427.8	2.03	1.75
	12	1125.8	2.01	1.47
	13	1886.1	2.01	1.68
	14	737.2	1.99	1.53
	15	1412.5	2.03	2.02
	16	572.8	1.95	1.8
	17	820.8	2	1.82
	18	560.1	1.96	1.72
	19	801.6	1.96	1.62
	20	375.6	1.93	1.6
	21	940.1	1.99	1.83
	22	344.2	2	1.85
	23	151.2	1.05	1.72
	24	127.6	2.28	1.61
	25	440.3	2.05	1.72
	26	246.2	1.81	1.92
	27	165.1	1.83	1.92
	28	267.3	1.83	1.92
	29	174.9	1.93	1.85
	30	142.6	1.84	1.53
	31	328.9	1.89	1.83
	32	212.2	1.9	1.83
	33	300.2	1.9	1.63
	34	313.7	1.95	1.69
	35	215.3	2.08	1.76
	Promedio	594.56	1.94	1.65
	Desv. Estándar	481.42	0.18	0.25
	Mínimo	127.60	1.05	1.04
	Máximo	1904.50	2.28	2.02

Se presenta los resultados de cuantificación de ARN total (ng/uL), índice de absorbancia 260/280 y 260/230 (NanoDrop Thermo scientific 1000) obtenidos para el ARN total extraído de las hojas de 35 plantas de chalote regeneradas a partir de meristemas apicales aislados.

Anexo 3: Cuantificaciones de ARN total de hojas de cebolla chalote regeneradas a partir de cultivo de meristemas apicales y termoterapia

	N°	Concentración (ng/uL)	A 260/280	A 260/230
TERMOTERAPIA	1	105	1.88	1.42
	2	96.5	2.04	1.91
	3	246.1	2.04	1.66
	4	189.2	1.81	1.4
	5	189.5	1.91	1.91
	6	186.5	1.83	1.95
	7	185	1.97	1.3
	8	506.5	1.96	1.7
	9	475.6	1.97	1.6
	10	226.1	2.02	1.96
	11	189.2	1.81	1.94
	Promedio	235.93	1.93	1.70
	Desv. Estándar	133.79	0.09	0.25
	Mínimo	96.5	1.81	1.3
Máximo	506.5	2.04	1.96	

Se presenta los resultados de cuantificación de ARN total (ng/uL), índice de absorbancia 260/280 y 260/230 (NanoDrop Thermo scientific 1000) obtenidos para el ARN total extraído de las hojas de 11 plantas de chalote regeneradas de meristemas apicales aislados combinado con termoterapia.