



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

## SANEAMIENTO DE VIRUS A TRAVÉS DE TERMOTERAPIA Y CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS EN UNA VARIEDAD Y DOS PORTAINJERTOS DE CEREZO

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniera Agrónoma y al Grado de  
Magíster en Ciencias Agropecuarias

**CONSTANZA FRANCISCA GONZÁLEZ LEVIÑIR**

**Directores de Tesis**

NICOLA FIORE

ALAN ZAMORANO CARRASCO

**Profesores consejeros**

JOSÉ LUIS HENRÍQUEZ SÁEZ

ELÍAS OBREQUE SLIER

SANTIAGO - CHILE

2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**SANEAMIENTO DE VIRUS A TRAVÉS DE TERMOTERAPIA Y  
CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES MERISTEMÁTICOS EN UNA  
VARIEDAD Y DOS PORTAINJERTOS DE CEREZO**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de  
Ingeniera Agrónoma y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

**CONSTANZA FRANCISCA GONZÁLEZ LEVIÑIR**

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
<b>DIRECTORES DE TESIS</b>		
Nicola Fiore Ingeniero Agrónomo, Dr.	7,0	7,0
Alan Zamorano C. Bioquímico, Dr.	7,0	7,0
<b>PROFESORES CONSEJEROS</b>		
José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.	6,8	6,8
Elías Obreque S. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,5	6,5

Santiago, Chile  
2021

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Carmen y Luis, expresarles mi enorme gratitud por su apoyo incondicional durante esta etapa y en la vida, por su amor y cariño.

A mis hermanos Mauricio y Jaime, por sus consejos, sus risas y preocupación durante este proceso.

A Carlos, por ser mi compañero de vida y amigo, por el apoyo, la confianza y su inmenso amor.

A mis profesores guías, Nicola Fiore y Alan Zamorano, por la oportunidad, los consejos, la paciencia y el apoyo brindado durante esta etapa.

A todo el equipo del Laboratorio de Fitovirología, por todo el cariño, las enseñanzas y apoyo infinito.

A mis amigos de la universidad, con quienes compartí maravillosos momentos y apoyaron día a día.

Finalmente, agradecer al proyecto FONDEF ID15I20087 “Innovación en la detección de virus y viroides en cerezo en Chile” por financiar esta investigación.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
Ubicación del estudio .....	14
Material biológico .....	14
Tratamientos y diseño del ensayo.....	14
Manejo del experimento .....	14
Detección de virus en pre-saneamiento en el material vegetal inicial sintomático .....	14
Establecimiento de plantas <i>in vitro</i> .....	18
Micropropagación.....	18
Detección viral en pre-saneamiento <i>in vitro</i> .....	19
Tratamientos para la obtención de plantas sanas .....	19
Detección viral en post-saneamiento .....	20
Evaluaciones.....	20
Análisis estadístico .....	20
RESULTADOS.....	21
Detección de virus en pre-saneamiento en el material inicial sintomático.....	21
Establecimiento de plantas <i>in vitro</i> y multiplicación.....	21
Detección viral en pre-saneamiento <i>in vitro</i> .....	23
Supervivencia de los explantes .....	24
Efectividad en la eliminación de virus.....	27
DISCUSIÓN .....	29
CONCLUSIONES .....	33
LITERATURA CITADA.....	34

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 1. Partidores utilizados para la detección de virus en cerezo.....	17
Cuadro 2. Análisis virológico en pre-saneamiento de las ramillas provenientes de plantas de campo que presentaron síntomas de virosis.....	21
Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia <i>in vitro</i> , de necrosis y contaminación luego de cuatro semanas de introducción.....	22
Cuadro 4. Número de explantes obtenidos luego de dos repiques del material establecido.....	22
Cuadro 5. Virus detectados en las distintas líneas madres de portainjertos y variedad micropropagados <i>in vitro</i> .....	24
Cuadro 6. Tasa de sobrevivencia de los explantes de cerezos tratados <i>in vitro</i> .....	25
Cuadro 7. Número de explantes que resultaron negativos al ser analizadas por RT-PCR al término de la aplicación de cada técnica.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Explantes de cerezos establecidos *in vitro*. (A) Explantes de Regina establecidos con éxito en medio de cultivo MS. (B) Explantes de Regina con presencia de bacterias endófitas.....22
- Figura 2. Algunas de las líneas que se seleccionaron para el análisis *in vitro*. (A) Explantes de Maxma 14 (a); (B) explantes de Maxma 14 (b); (C) explantes de Regina (a) y (D) explantes de Colt (a). .....23
- Figura 3. Explantes de cerezos después de la aplicación de las técnicas de saneamiento. (A) Efecto en los ápices de cerezos expuestos a altas temperatura. (B) Brotes regenerados de un meristema de Colt, sometido a termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos. (C) Callo formado desde un meristema de cerezo. ....25
- Figura 4. Porcentajes de explantes sobrevivientes. (A) Efecto del factor tratamiento en la supervivencia de los explantes; T1: Termoterapia; T2: Cultivo de explantes de ápices meristemáticos; T3: Termoterapia asociada a cultivo de explantes de ápices meristemáticos. (B) Efecto del factor genotipo en la supervivencia de los explantes. Medias con una letra en común para cada gráfica no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p>0,05$ ).....26
- Figura 5. Porcentajes de explantes con resultado negativo a la presencia de virus mediante RT-PCR, considerando todos los explantes que murieron durante el proceso y, por lo tanto, no lograron sanearse. (A) Efecto de factor tratamiento en la eliminación de los virus de los explantes; T1: Termoterapia; T2: Cultivo de explantes de ápices meristemáticos; T3: Termoterapia asociada a cultivo de explantes de ápices meristemáticos. (B) Efecto del factor genotipo en la eliminación de los virus de los explantes. Medias con una letra en común para cada gráfica no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p>0,05$ ).....28

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.....	40
ANEXO 2.....	41
ANEXO 3.....	42

**ÍNDICE DE APÉNDICE**

APÉNDICE I.....43  
APÉNDICE II.....45



## RESUMEN

*Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Cherry virus A* (CVA) y *Little virus 1* (LChV-1), son virus que afectan al cerezo. Se estudió la posibilidad de obtener material de propagación libre de estos virus, a través de termoterapia, cultivo de ápices meristemáticos, y la combinación de ambas técnicas en los portainjertos de cerezo Maxma 14, Colt y en la variedad Regina. Se evaluó la tasa de supervivencia de los explantes y la eficiencia en la erradicación de los virus mediante RT-PCR. La combinación de termoterapia (4 semanas a una temperatura máxima de 36°C) y la escisión de ápices meristemáticos (1 – 2 mm) logró una baja tasa de sobrevivencia de los explantes, pero permitió obtener más del 60% de plantas libres de virus, en comparación con los otros dos tratamientos estudiados donde la eficiencia de eliminación fue mucho menor, alcanzando los valores en promedios del 13,33% y 41,25%, respectivamente. En este experimento se concluyó que la termoterapia asociada a cultivo de explantes de ápices meristemáticos es un método eficaz y eficiente para la eliminación de virus que infectan a cerezos.

Palabras claves: Cultivo de tejidos, eliminación de virus, *Prunus avium* L.

**ABSTRACT**

*Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Cherry virus A* (CVA) and *Little cherry virus 1* (LChV-1), are viruses that affect sweet cherry trees. The possibility of obtaining plant material free of these viruses through thermotherapy, meristem-tip culture, and the combination of both techniques in cherry rootstocks Maxma 14, Colt and in the variety Regina, was studied. The survival rate of the explants and the efficiency in the eradication of the viruses determined by RT-PCR were evaluated. The combination of thermotherapy (4 weeks at a maximum temperature of 36 ° C) and excision of meristem-tip culture (1 - 2 mm) determined a low survival rate of the explants, but allowed more than 60% of virus-free plants, compared to the other two treatments studied where the elimination efficiency was much lower, reaching average values of 13.33% and 41.25%, respectively. In this experiment it was concluded that the combination of thermotherapy and meristem-tip culture is an effective and efficient method for virus elimination in sweet cherry trees.

Keywords: Tissue culture, virus elimination, *Prunus avium* L.

## INTRODUCCIÓN

Chile se ha posicionado como el principal productor de cerezas en el hemisferio sur y un líder mundial en la exportación de cerezas, llegando a exportar 180.000 toneladas de frutos frescos, siendo el principal país de destino China (Banco Central, 2018). Todo lo anterior, ha generado un aumento progresivo de la superficie plantada con cerezos alcanzando 39.645 hectáreas (ODEPA, 2020), donde las principales variedades son Lapins, Santina, Regina y Bing, mientras que los principales portainjertos son Colt, Gisela 6, Maxma 14 y Gisela 12 (ODEPA, 2015).

Existen diversas enfermedades descritas en cerezo en el mundo, estas son producidas por hongos y pseudohongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nematodos (Latorre, 2008; Hadidi and Barba, 2011). Entre los agentes bióticos que causan pérdidas económicas importantes en cerezos están los virus, los que pueden generar una disminución en la producción de los frutos que oscila entre 20% y 95% a nivel predial y en la calidad organoléptica de éstos, dependiendo tanto de la especie viral como del número de virus que se encuentren infectando simultáneamente a las plantas (Hadidi and Barba, 2011).

Las especies virales que han sido reportadas en cerezos en Chile corresponden a *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV), *Cherry virus A* (CVA) y *Little cherry virus 1* (LChV-1) (Fiore and Zamorano, 2013; Fiore *et al.*, 2016; Zamorano *et al.*, 2017; Fiore *et al.*, 2018). Los virus con mayor prevalencia e importancia a nivel predial como en viveros son PNRSV, PDV y ACLSV (Herrera and Madariaga, 2002; Fiore *et al.*, 2016). Todos los virus mencionados anteriormente pueden ser transmitidos por material de propagación infectado, algunos también por polen, semillas y/o vectores (Hadidi *et al.*, 2011).

Debido a la inexistencia de un método de control efectivo en campo, la principal estrategia para evitar la presencia de estos patógenos es la prevención, por lo tanto, la utilización de material de propagación libre de virus es una de las medidas de control fundamental en la lucha contra estos patógenos (Wang *et al.*, 2008), junto con un diagnóstico oportuno que permita una remoción rápida de árboles infectados con el fin de limitar su diseminación (Hadidi *et al.*, 2011).

Dado lo anterior, uno de los desafíos que enfrenta Chile es la obtención de material de propagación con altos estándares de calidad, tanto productivos como fitosanitarios, lo que hace necesario contar con técnicas de diagnóstico y de saneamiento *in vitro* para disponer de material de propagación apto para el mercado frutícola del país.

Para la obtención de plantas libres de virus existen diversas técnicas que se pueden aplicar *in vitro*; como la termoterapia, cultivo de meristemas, embriogénesis somática, quimioterapia, crioterapia y electroterapia (Bayati *et al.*, 2011; Panattoni *et al.*, 2013). El cultivo *in vitro* corresponde al cultivo aséptico de células, tejidos, órganos o plantas enteras bajo condiciones

nutricionales y ambientales controladas, se basa en la totipotencialidad y plasticidad celular (Takebe *et al.*, 1971; Thorpe, 2007). Esta técnica permite la aplicación de un gran número de tratamientos en un espacio relativamente pequeño (Spiegel *et al.*, 1993; Gella and Errea, 1998). La termoterapia junto con el cultivo de meristemas *in vitro* son las técnicas de saneamiento más utilizadas y que han logrado la eliminación de diversos virus en distintas especies frutales (Panattoni *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

La termoterapia consiste en mantener las plantas, o partes de ellas, a temperaturas altas que fluctúan usualmente entre los 35-54°C por un periodo de tiempo adecuado, sin sobrepasar los límites de tolerancia fisiológica de cada especie vegetal. La selección de la temperatura debe asegurar la degradación del virus y la supervivencia de la planta, bajo la premisa que la sensibilidad a una determinada temperatura puede ser mayor para la planta que para varias especies de virus (Spiegel *et al.*, 1993). Temperaturas por sobre los 35°C generan diversas alteraciones en las partículas virales, provocando una disminución en la capacidad infectiva del virus, a través de la inhibición de la replicación viral (Panattoni *et al.* 2013). Además, la alta temperatura activa el silenciamiento génico, que es una estrategia de defensa de las plantas hacia los virus (Wang *et al.*, 2008).

Por otro lado, el cultivo de meristemas se basa en el aislamiento de tejido meristemático de la planta, que se cultiva en un medio artificial con presencia de reguladores de crecimiento y bajo condiciones adecuadas puede crecer y desarrollarse en una planta completa (Holligs, 1965). Los meristemas podrían tener una baja o nula concentración de virus, debido a que es una zona con una alta y continua tasa de división celular, y los elementos del sistema vascular no se encontrarían diferenciados, lo que dificultaría la presencia de virus (Panattoni *et al.*, 2013).

En la actualidad existen pocos estudios sobre saneamiento en cerezos en el mundo, que permita la obtención y mantenimiento de variedades y portainjertos de cerezo libres de virus. Deogratias *et al.* (1989a) sometieron a un régimen térmico de 34-35°C por 3 semanas a explantes de cerezos 'Van 2D' cultivados *in vitro* e infectados con PNRSV y PDV, el 30% de los explantes que sobrevivieron al tratamiento lograron sanearse. En cambio, Gella y Errea (1998) lograron eliminar PDV de cerezos 'Silvia' y 'Celeste' propagados *in vitro* con un 85% y 100% de éxito a los 21 y 24 días en la var. Silvia, y un 100% de éxito a los 22 días en la var. Celeste, aplicando una temperatura constante de 37±1°C y posterior cultivo de ápices caulinares de 1-2 mm de longitud. Por consiguiente, el uso de estas técnicas podría generar material de propagación libres de virus para variedades y portainjertos de cerezos que actualmente se comercializan en Chile.

## **HIPÓTESIS**

A través del uso de termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos *in vitro*, se obtienen variedades y portainjertos de cerezo libres de virus.

## **OBJETIVOS**

Obtener una variedad y dos portainjertos de cerezo, libres de virus, mediante el uso de las técnicas de termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos *in vitro*.

### **Objetivo Específico:**

Desarrollar un protocolo de saneamiento de virus para cerezo Regina, y los portainjertos Colt y Maxma 14, utilizando las técnicas de termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del estudio

Ensayos y análisis se realizaron en el Laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal (33°34'08,0"S 70°38'00,9"O).

### Material biológico

Como material vegetal inicial se seleccionaron ramillas en activo crecimiento de dos plantas de *Prunus avium* L. Regina, de dos plantas del portainjerto Colt (*P. avium* × *Prunus pseudocerasus*) y de dos plantas del portainjerto Maxma 14 (*Prunus mahaleb* × *P. avium*). Las plantas presentaban síntomas virosis y provenían de la Agrícola Sacramento, ubicada en la comuna de Buin en la Región Metropolitana.

### Tratamientos y diseño del ensayo

Para la realización de esta investigación se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con estructura factorial de tratamiento, en donde se evaluaron dos factores. El primer factor correspondió a los tratamientos, donde se evaluaron las técnicas de saneamiento Termoterapia (T1), Cultivo de ápices meristemáticos (T2) y Termoterapia asociada al cultivo de ápices meristemáticos (T3), además, se consideró un control (T0), en el cual no se aplicó ninguna técnica de saneamiento. El segundo factor correspondió a las plantas de los genotipos Colt, Maxma 14 y Regina que lograron propagarse con éxito *in vitro*. Todos los tratamientos se realizaron en paralelo. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un explante en medio de cultivo, con 15 repeticiones por cada tratamiento.

### Manejo del experimento

#### Detección de virus en pre-saneamiento en el material vegetal inicial sintomático

**Extracción de ácidos nucleicos totales (ANT).** Para la obtención de cada ANT desde las muestras colectadas, se utilizó el método de captura por sílica (MacKenzie *et al.*, 1997; Malinovski 1997). Para cada planta, se usaron 0,15 g de tejido floemático provenientes de dos ramillas (parte basal de las ramillas). El tejido fue macerado con 1,5 mL de tampón de

extracción (tiocianato de guanidinio 4,0 M, acetato de sodio 0,2 M, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 M, PVP 40 kdal 2,5% p/v y 3 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). A 1 mL de macerado se agregaron 300  $\mu$ L de lauril sarcosyl sulfato de sodio (NaLS) al 10%. La mezcla se homogenizó en un vórtex durante un minuto y luego se incubó a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó 300  $\mu$ L del sobrenadante y se mezcló con 150  $\mu$ L de etanol absoluto, 300  $\mu$ L de yoduro de sodio (NaI) 6 M y 50  $\mu$ L de solución de sílica. Se homogenizó e incubó, a través de agitación por inversión, a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego, se centrifugó a 7.000 rpm por un minuto y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el sedimento con 500  $\mu$ L de tampón de lavado (50% etanol, 10 mM de Tris HCl pH 8,0 1mM de EDTA) y se agitó con vórtex para resuspenderlo totalmente. Después, se centrifugó a 7.500 rpm por un minuto, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril e incubado a 70°C por 4 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13.500 rpm durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

**Comprobación de la viabilidad de los extractos de ácido nucleicos totales (ANT).** Se realizó un PCR utilizando partidores específicos que amplificaron un segmento del gen que codifica para la enzima Rubisco, el cual está presente en el genoma de las plantas. Los partidores utilizados fueron: Rbc-F 5' TACTTGAACGCTACTGCAG-3' y Rbc1-R 5'-CTGCATGCATTGCACGGTG-3', cuyo producto de amplificación es de 183 bp (Fuchs *et al.*, 2010).

**Transcripción inversa.** El genoma de los virus analizados está constituido por RNA, por lo que se sintetizó su ADN complementario (ADNc) mediante una transcripción inversa (RT) (Mackenzie *et al.*, 1997). Para cada ANT se preparó un mix con 19  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, 1  $\mu$ L de partidores de DNA, hexanucleótidos al azar (Roche, Basel, Switzerland) y 10  $\mu$ L del extracto ANT. Adicionalmente, se preparó una muestra sin ANT y con agua bidestilada estéril, como control negativo. El ADN de las muestras fue desnaturalizado a 95°C durante 5 minutos y retrotranscrito con 1  $\mu$ L *Moloney murine leukaemia virus* retrotranscriptasa (M-MLV RT; Promega, Madison, Wisconsin, USA), 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, 10  $\mu$ L de tampón MMLV 5x, 2,5  $\mu$ L de DTT 0,1 M y 2,5  $\mu$ L de dNTPs. El programa de retrotranscripción consistió en 10 minutos a 39°C, 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 72°C. El ADNc resultante se almacenó a 4°C.

**Detección de virus con PCR.** Se utilizó esta técnica para la detección de los 10 virus que actualmente se han reportado en el país. Para la amplificación se utilizó un volumen de reacción de 30  $\mu$ L, constituido por 2  $\mu$ L de ADNc y 28  $\mu$ L de mix de amplificación compuesto por 1  $\mu$ L d-NTP, 1  $\mu$ L de cada partidore, 1,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ L Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil), 3  $\mu$ L de buffer y 21  $\mu$ L agua bidestilada estéril. Para cada virus se utilizaron partidores específicos obtenidos en su mayoría de la literatura especializada y diseñados en regiones del genoma altamente conservadas (Cuadro 1).

**Electroforesis.** Los productos de amplificación procedentes de PCR se separaron con electroforesis en gel de agarosa 1,2% utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). La corrida electroforética duró 25 minutos a 500

amperes y 120 voltios. Los productos de amplificación se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV y el gel se fotografió utilizando el equipo de fotodocumentación de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó 3,5  $\mu$ L de ADN ladder 100 bps (Invitrogen).



Cuadro 1. Partidores utilizados para la detección de virus en cerezo.

Virus	Partidores	Secuencia 5' – 3'	Producto de amplificación (bp)	Gen	Referencia Bibliográfica
CGRMV	GRM8316 GRM7950	CCTATAGCCAGTCTTCATATTATG GCAGCCTTTGACTTTTTTGGAG	366	Proteína de cubierta	Rott and Jelkmann 2001
PNRSV	C537 H83	ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAG	455	Proteína de cubierta	MacKenzie <i>et al.</i> , 1997
LChV-1	LCV-H90-F LCV-H90-R	TCAACCCACTGTAATGGATAAATG TCACTTTATGTGGTTTCATCAAAT	204	HSP90-like	Fiore <i>et al.</i> , 2018
CNRMV	DetCNR-F DetCNR-R	TCCCACCTCAAGTCCTAGCAGAGA TCATTGCTAATTGCAAAATCCCA	333	Proteína de cubierta	Fiore and Zamorano, 2013
ApMV*	ApMCP1 ApMV-1R ApMCP2 ApMV-1F	ATGGTCTGCAAGTACTGTGGTC GCGGCGAAATTCGTCTTAAACT CACGAAGTCATCAAAAGTTGTG AGAAGTGACTGCCACGGTTGAAG	268	Proteína de cubierta	Fiore <i>et al.</i> , 2016
ACLSV	ApCLCP1 ApCLCP2	GATCAGAAGGCGGAGGATGG CTAAATGCAAAGATCAGTTGYAACA	599	Proteína de cubierta	Diseñados en el Lab. de Fitovirología, U. de Chile
PBNSPaV	PBN-RdRp-F PBN-RdRp-R	CTTATTATTGTGCTGAAGTTGATCT TGGAAAAGTATTGAGTCATCACC	350	RdRp	Zamorano <i>et al.</i> , 2017
CVA	CVAF2 CVAR2	ACTGCAGAGAAAACAACTGCC AGGCCCTTCTTATCTCGTT	436	Proteína de movimiento	Zamorano <i>et al.</i> , 2017
PDV	PDVR2 PDVF2	CTCTCTTGGGCATCGAGTGT TCGAAGTCTATTTCCGAGTGG	451	Proteína de cubierta	Diseñados en el Lab. de Fitovirología, U. de Chile
ToRSV*	ToRSV-F-Fuchs ToRSV-R-Fuchs D1 U1	ACTTCTGAAGGCTACCCGTT CCACCACACTCCACCTACC TCCGTCCAATCACGCGAATA GACGAAGTTATCAATGGCAGC	392	RdRp	Rivera <i>et al.</i> , 2016

\* Los análisis se realizarán a través de PCR anidado.

## **Establecimiento de plantas *in vitro***

**Desinfección del material vegetal.** La sección apical de las ramillas destinadas al establecimiento *in vitro* se lavaron con detergente líquido durante 15 minutos, se eliminaron las hojas y cortaron en segmentos nodales de 2-3 cm. Se sumergieron en agitación constante en una mezcla de fungicidas ( $1,3 \text{ g L}^{-1}$  de Captan,  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de Tebuconazol y  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de Carbendazima) durante 20 minutos y se enjuagaron con agua potable. Posteriormente, dentro de una cámara de flujo laminar los segmentos nodales se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 20% más 2 gotas del tensioactivo Tween 20® por 20 minutos en agitación constante y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Los segmentos nodales se tomaron con una pinza estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Finalmente, fueron colocados sobre una placa Petri estéril y con ayuda de un bisturí se obtuvieron segmentos uninodales o binodales, todos con un corte en diagonal en la parte inferior, cuyo fin es aumentar la superficie de contacto con el medio.

**Medios y condiciones de cultivo.** El establecimiento inicial de los segmentos uni/binodales se realizó al interior de una cámara de flujo laminar horizontal. Para los portainjertos se utilizó el medio de cultivo DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) con modificaciones (ANEXO 1), en adición de  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  de benciladenina (BAP),  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftalenacético (ANA), sacarosa al 3% como fuente de carbono y agar al 0,7% como agente gelificante. Por otro lado, para el establecimiento inicial de Regina se utilizó el medio MS (Murashige and Skoog, 1962) (ANEXO 1), suplementado con  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, sacarosa al 2% y agar al 0,7%. El pH de ambos medios se ajustó a un valor de 5,8 con HCl 1 N y/o NaOH 1 N, antes de ser autoclavados a 1,2 atmósfera de presión, a  $121^\circ\text{C}$ , durante 20 minutos.

Los explantes de cerezos propagados *in vitro* fueron mantenidos en cámara de crecimiento a una temperatura de  $24^\circ\text{C} \pm 1$ , una intensidad luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, por 4 semanas.

## **Micropropagación**

**Multiplicación de explantes y medios de cultivo.** Para llevar a cabo la fase de multiplicación, se realizaron subcultivos cada 3-4 semanas de los explantes establecidos con la finalidad de conseguir material vegetal suficiente para iniciar los diferentes experimentos. La multiplicación *in vitro* de los explantes de los genotipos de cerezo se realizaron en los medios de cultivos utilizados en la fase de establecimiento, la concentración de los reguladores de crecimiento de BAP y ANA se mantuvieron, pero se les adicionó a ambos medios de cultivo  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) (ANEXO 2). Los subcultivos micropropagados fueron colocados en cámara de crecimiento con las condiciones ambientales establecidas en la fase de establecimiento.

### **Detección viral en pre-saneamiento *in vitro***

Se realizó un análisis por RT-PCR del material *in vitro* con el objetivo de corroborar la presencia de los virus detectados inicialmente. Posteriormente se realizaron subcultivos de aquellos explantes que dieron positivos a los virus para obtener material uniforme y suficiente para cubrir todos los tratamientos.

### **Tratamientos para la obtención de plantas sanas**

**Termoterapia (T1).** Los explantes fueron cultivados en los medios de cultivos de multiplicación respectivos, fueron colocados en una cámara de termoterapia al interior de un recipiente lleno de agua, con el fin de bajar la temperatura de los medios y así no alterar sus propiedades físico-químicas. La temperatura se incrementó gradualmente desde los 28°C a 36°C en una semana y luego fue mantenida a 36 °C durante 4 semanas. Finalizado el tratamiento térmico, fueron llevados a la cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones ambientales de la fase de multiplicación por siete días, para favorecer la reactivación de las plantas después del tratamiento térmico. Luego, se procedió al aislamiento de ápices caulinares de una longitud de 0,5 a 1 cm, de aquellos brotes que sobrevivieron a la termoterapia, que fueron colocados en los medios cultivos utilizados en la multiplicación y mantenidos en la cámara de crecimiento durante 6 semanas.

**Cultivo de ápices meristemáticos (T2).** En una cámara de flujo laminar horizontal y con la ayuda de un microscopio estereoscópico con luz led, se extrajeron ápices meristemáticos de una longitud de 0,1 - 0,2 mm. Los ápices meristemáticos fueron introducidos en el medio de cultivo descrito por Druart (2013) (ANEXO 3), suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup>AG<sub>3</sub>, sacarosa al 2%, agar al 0,7% y pH 5,8. Posteriormente, fueron llevados a la cámara de crecimiento, durante 12 semanas. Cuando los ápices meristemáticos desarrollaron una o dos hojas se cambiaron a los medios de cultivo utilizados en la fase de multiplicación.

**Termoterapia asociada a cultivo de ápices meristemáticos (T3).** Inicialmente se llevó a cabo la termoterapia, cuyo protocolo de régimen de temperaturas fue el mismo que el utilizado en T1. Finalizado el tratamiento y transcurrido los 7 días de recuperación se llevó a cabo el aislamiento de explantes de ápices meristemáticos utilizando el protocolo descrito en el T2.

**Plantas control (T0).** Explantes fueron mantenidos en cámara de crecimiento, bajo las mismas condiciones ambientales y medios de cultivos usados en la fase de multiplicación, durante 12 semanas. Cada 3 semanas se realizaron recambios de medios.

### **Detección viral en post-saneamiento**

Para validar el éxito del saneamiento se realizó un análisis de detección viral mediante RT-PCR en los nuevos explantes obtenidos al final de los tratamientos, y un segundo análisis a los seis meses en los explantes que obtuvieron preliminarmente un resultado negativo, utilizando el mismo procedimiento descrito para la detección de virus en pre-saneamiento del material vegetal inicial sintomático.

### **Evaluaciones**

Se evaluó la sobrevivencia de los explantes al finalizar los tratamientos y la efectividad de los tratamientos en la eliminación de virus mediante la técnica molecular RT-PCR.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado con respuesta binomial y función de enlace logit. Se realizó un test de Wald, en caso de existir diferencias estadísticamente significativas entre los factores bajo interacción o de manera independiente, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher al 0,05 de probabilidad. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Infostat.

## RESULTADOS

### Detección de virus en pre-saneamiento en el material inicial sintomático

Para la realización del experimento se necesitaba contar con material vegetal infectado con virus. Por lo tanto, durante primavera se seleccionaron ramillas en activo crecimiento provenientes de plantas que presentaban síntomas de virosis y fueron analizadas por RT-PCR, todas las muestras presentaron infecciones virales; dos muestras presentaron infecciones virales simples, dos muestras infecciones virales dobles y dos muestras infecciones triples (Cuadro 2). Las especies virales prevalentes en los distintos genotipos fueron PNRSV y CVA. Además, se observó la presencia de los virus LChV-1, PDV y ACLSV.

Cuadro 2. Análisis virológico en pre-saneamiento de las ramillas provenientes de plantas de campo que presentaron síntomas de virosis.

Genotipo*	Virus									
	PNRSV	PDV	CVA	CNRMV	CGRMV	LChV-1	ACLSV	PBNSPaV	ToRSV	ApMV
Maxma 14 (a)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Maxma 14 (b)	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Colt (a)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Colt (b)	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Regina (a)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Regina (b)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Para cada genotipo se seleccionaron y analizaron ramillas provenientes de dos plantas (a y b).

### Establecimiento de plantas *in vitro* y multiplicación

En forma paralela al análisis virológico de las muestras, la parte apical de las ramillas destinadas a la propagación *in vitro* fueron desinfectadas e introducidas en sus medios de cultivos respectivos. Todas las muestras provenientes de los distintos genotipos se lograron establecer *in vitro*, aunque algunas con mayor éxito que otras (Cuadro 3). Las pérdidas generadas por contaminación fueron mayores que las generadas por necrosis, siendo los organismos endófitos los que más afectaron el establecimiento inicial del material vegetal (Figura 1). A pesar del éxito de la etapa de establecimiento, las muestras Colt (b) y Regina (b) no lograron sobrevivir en la etapa de multiplicación, debido a la calidad del material inicial junto a la presencia de bacterias endófitas que afectaron el desarrollo de los explantes (Cuadro 4). Regina (a) solo tuvo un repique de su material producto de su alto número de explantes establecidos inicialmente.

Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia *in vitro*, de necrosis y contaminación luego de cuatro semanas de introducción.

Genotipo	Nº de explantes introducidos	Nº de explantes establecidos	Supervivencia <i>in vitro</i> (%)	Necrosis (%)	Contaminación <i>in vitro</i> (%)
Maxma 14 (a)	14	6	42,86	21,43	35,71
Maxma 14 (b)	19	9	47,37	21,05	31,58
Colt (a)	27	16	59,26	11,11	29,63
Colt (b)	21	7	33,33	19,05	47,62
Regina (a)	36	25	69,44	11,11	19,44
Regina (b)	17	3	17,65	17,65	64,71

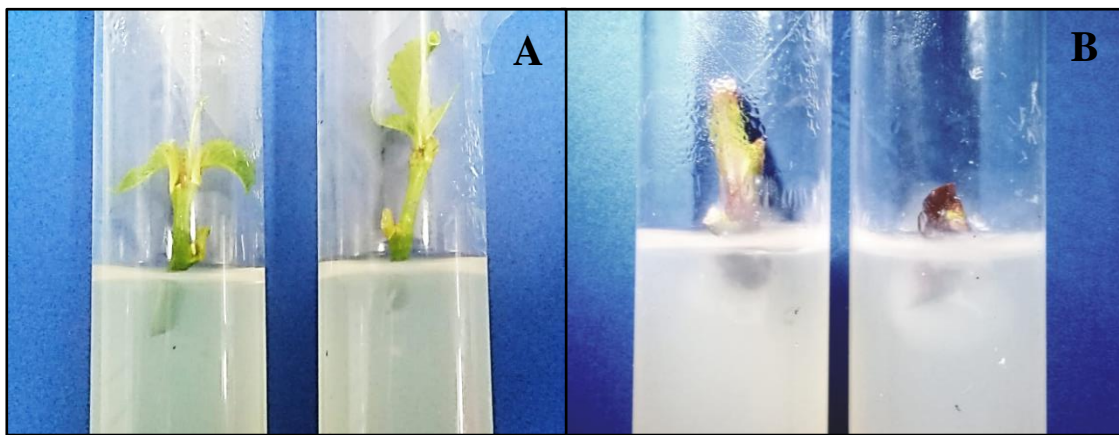


Figura 1. Explantes de cerezos establecidos *in vitro*. (A) Explantes de Regina establecidos con éxito en medio de cultivo MS. (B) Explantes de Regina con presencia de bacterias endófitas.

Cuadro 4. Número de explantes obtenidos luego de dos repiques del material establecido.

Genotipo	Nº de explantes establecidos	Nº de explantes luego del 1º repique	Nº de explantes luego del 2º repique
Maxma 14 (a)	6	10	23
Maxma 14 (b)	9	7	8
Colt (a)	16	21	35
Colt (b)	7	0	0
Regina (a)*	25	36	-
Regina (b)	3	0	0

\* Regina (a) solo tuvo un repique

### Detección viral en pre-saneamiento *in vitro*

Se realizó un nuevo análisis por RT-PCR para verificar la presencia de los virus en el material *in vitro*, se eligieron aquellos explantes que poseían una longitud superior a 3 cm y más de 3-4 brotes, con el objetivo de extraer material para su análisis y para seguir micropropagando esas líneas (Figura 2). En una primera instancia, se comprobó la viabilidad de los extractos de ácido nucleicos totales (ANT), mostrando que todos los ANT eran viables. Los análisis virológicos revelaron que en todas las líneas de los portainjertos se detectó presencia de virus en infecciones mixtas o simples. Solo en Regina (a) hubo explantes sin detecciones virales (Cuadro 5). En el Cuadro 5 se observa que en solo el 87,5% de las líneas de Maxma 14 (a) detectó CVA y solo dos líneas presentaron infecciones dobles de CVA y PNRSV. Por otro lado, en todas las líneas de Maxma 14 (b) se mantuvieron los virus que inicialmente se detectaron (PNRSV, CVA y LChV-1). En Colt (a) en el 92,8% de las líneas se detectaron CVA y PNRSV, y en Regina (a) solo en 4 líneas se detectó PNRSV.

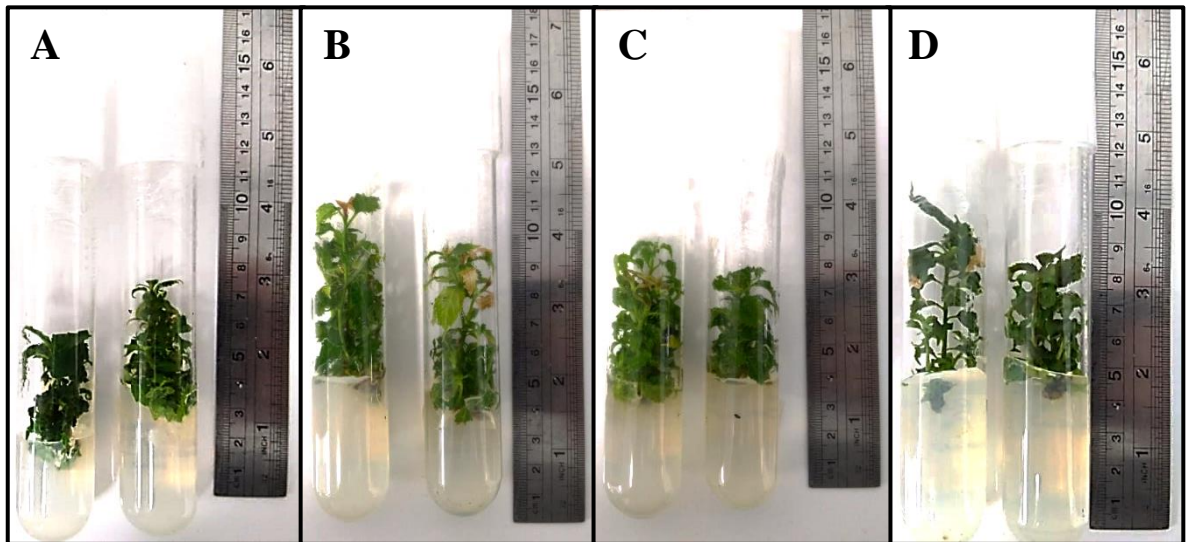


Figura 2. Algunas de las líneas que se seleccionaron para el análisis *in vitro*. (A) Explantes de Maxma 14 (a); (B) explantes de Maxma 14 (b); (C) explantes de Regina (a) y (D) explantes de Colt (a).

Cuadro 5. Virus detectados en las distintas líneas madres de portainjertos y variedad propagados *in vitro*.

Genotipo	Virus	Proporción de explantes positivas
Maxma 14 (a)	CVA	14/16
	CVA, PNRSV	2/16
Maxma 14 (b)	PNRSV, CVA, LChV-1	5/5
Colt (a)	CVA, PNRSV	13/14
	PNRSV	1/14
Regina (a)	PNRSV	4/16
	negativo	12/16

El material seleccionado para el proceso de saneamiento se basó en aquellas líneas que presentaron mayor uniformidad en las detecciones y se multiplicaron para obtener material suficiente para la aplicación de los tratamientos (APÉNDICE I). Por consiguiente, se seleccionaron las líneas positivas a CVA en Maxma 14 (a); para Maxma 14 (b), todas las líneas que eran positivas a la presencia de PNRSV, CVA y LChV-1; en Colt (a) se seleccionaron aquellas líneas positivas a CVA y PNRSV, en Regina aquellas positivas a PNRSV.

### Tratamientos para la obtención de plantas sanas

#### Supervivencia de los explantes

Posterior a la aplicación de las técnicas de saneamiento la mayoría de los explantes provenientes de termoterapia (T1) lograron sobrevivir con éxito al tratamiento térmico (Cuadro 6). La exposición prolongada a 36 °C generó un declive en el crecimiento y un aumento de la necrosis en los ápices de los explantes durante la última semana del tratamiento (Figura 3A), en éste periodo de la técnica se produjeron las muertes de los explantes y no durante la extracción de los ápices. En general, el cultivo de ápices meristemáticos (T2) logró una baja supervivencia, las líneas de Maxma 14 se vieron más afectadas. En el tratamiento T3, el cual combina las técnicas de T1 y T2, más de la mitad de los explantes de las líneas Colt (a) y Regina (a) lograron sobrevivir (Cuadro 6) (Figura 3B). La causa principal de la baja supervivencia en los tratamientos T2 y T3 fue por una escasa diferenciación de los meristemas, generando callos la mayoría de ellos (Figura 3C).



Cuadro 6. Tasa de sobrevivencia de los explantes de cerezos tratados *in vitro*.

Tratamiento	Número de explantes sobrevivientes/Número de explantes tratados			
	Maxma 14 (a)	Maxma 14 (b)	Colt (a)	Regina (a)
T0	15/15	15/15	15/15	15/15
T1	13/15	9/15	14/15	12/15
T2	1/15	5/15	10/15	8/15
T3	3/15	5/15	10/15	8/15

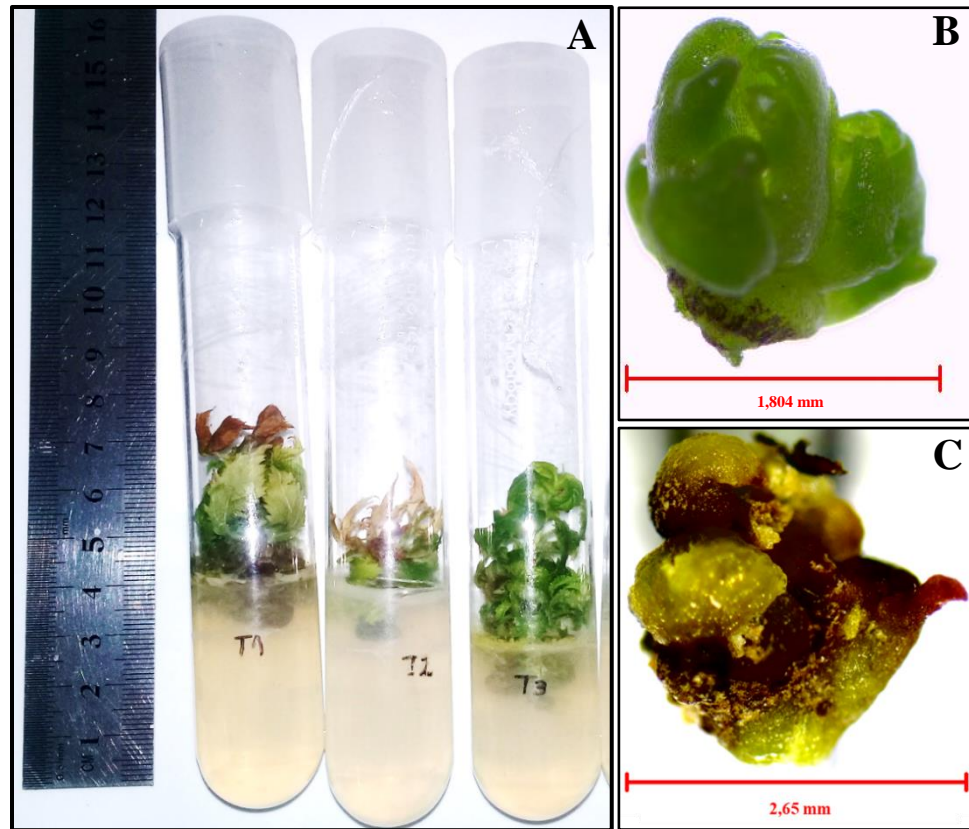


Figura 3. Explantes de cerezos después de la aplicación de los tratamientos de saneamiento. (A) Efecto en los ápices de cerezos expuestos a altas temperatura. (B) Brotes regenerados de un meristema de Colt, sometido a termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos. (C) Callo formado desde un meristema de cerezo.

Al evaluar el efecto de los factores tratamientos y genotipos, se logró establecer que solo existe un efecto significativo por separado de estos factores y no cuando interactúan. La termoterapia (T1) logró en promedio un 40% y 36,67% más de explantes sobrevivientes que el cultivo de ápices meristemáticos (T2) y que cuando se combinaron las técnicas (T3), diferenciándose estadísticamente de ellos (Figura 4A). Por otro lado, Colt fue el genotipo con mejores resultados de supervivencia, Regina obtuvo resultados similares a Colt, pero no logró diferenciarse estadísticamente de las Maxma 14; los cuales obtuvieron las peores sobrevivencias de explantes en todos los tratamientos (Figura 4B).

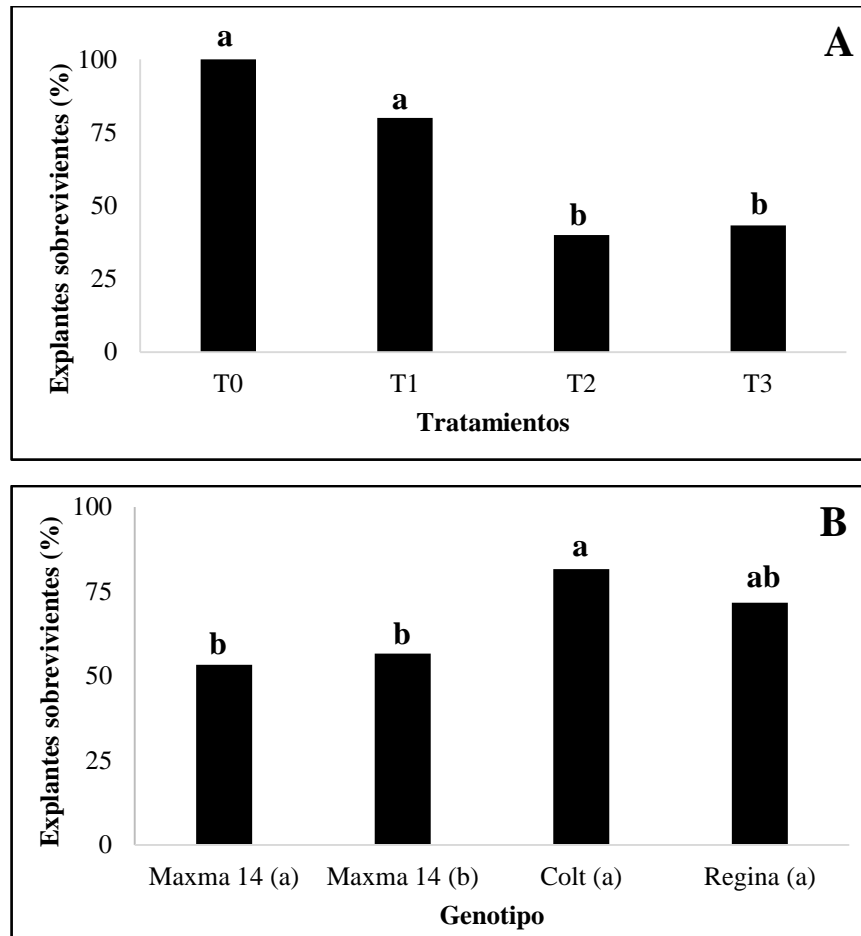


Figura 4. Porcentajes de explantes sobrevivientes. (A) Efecto del factor tratamiento en la supervivencia de los explantes; T1: Termoterapia; T2: Cultivo de ápices meristemáticos; T3: Termoterapia asociada a cultivo de ápices meristemáticos. (B) Efecto del factor genotipo en la supervivencia de los explantes. Medias con una letra en común para cada gráfica no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p > 0,05$ ).

### Efectividad en la eliminación de virus

Los resultados obtenidos del primer análisis de RT-PCR sugieren de forma preliminar que en los distintos tratamientos lograron la eliminación de los virus en los explantes. La termoterapia logró una baja eliminación de virus en relación a los explantes que fueron analizados. Por otro lado, el cultivo de ápices meristemáticos y la termoterapia más el cultivo de ápices meristemáticos lograron un mayor número de explantes negativos, a pesar de que el número de explantes analizados era menor que el de T1. En los controles también hubo líneas negativas a los virus que inicialmente se habían detectado (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de explantes que resultaron negativos al ser analizados por RT-PCR al término de la aplicación de cada tratamiento.

Tratamiento	Número de explantes negativos/Número de explantes analizados			
	Maxma 14 (a)	Maxma 14 (b)	Colt (a)	Regina (a)
T0	1/15	1/15	1/15	2/15
T1	1/13	1/9	1/14	2/12
T2	1/1	1/5	2/10	2/8
T3	2/3	4/5	6/10	6/8

Dentro de los explantes con resultados positivos a la presencia de virus mediante el RT-PCR, fue posible detectar infecciones virales simples, dobles y triples. Con el tratamiento T3 se obtuvieron buenos resultados en la eliminación de virus en Regina (a) que poseía infecciones simples por PNRSV y en las líneas de Colt (a) que poseía infecciones dobles por PNRSV y CVA. Además, no se detectaron infecciones simples de LChV-1 en las líneas de Maxma 14 (b) tratadas con los diferentes tratamientos, durante el primer análisis post saneamiento (APÉNDICE II).

Cuando se evaluó la eficacia del proceso de saneamiento completo, considerando los explantes muertos y que sobrevivieron, se logra evidenciar que solo existió un efecto estadísticamente significativo de los tratamientos y no así en los genotipos. La termoterapia asociada a cultivo de ápices meristemáticos obtuvo mejores resultados en la eliminación de virus, generando aproximadamente un 20% más de explantes libres de virus que T1 y T2 (Figura 5).

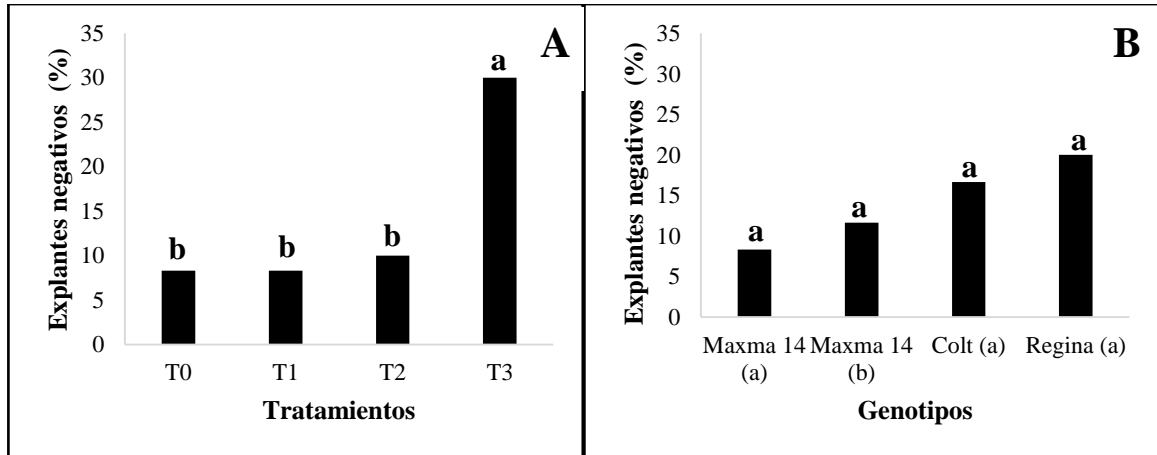


Figura 5. Porcentajes de explantes con resultado negativo a la presencia de virus mediante RT-PCR, considerando todos los explantes que murieron durante el proceso y, por lo tanto, no lograron sanearse. (A) Efecto de factor tratamiento en la eliminación de los virus de los explantes; T1: Termoterapia; T2: Cultivo de ápices meristemáticos; T3: Termoterapia asociada a cultivo de ápices meristemáticos. (B) Efecto del factor genotipo en la eliminación de los virus de los explantes. Medias con una letra en común para cada gráfica no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p > 0,05$ ).

Transcurrido seis meses desde el primer análisis, los mismos explantes que resultaron negativos en una primera instancia se volvieron a analizar. Una línea de Regina (a) resultó positiva a PNRSV y una línea de Maxma 14 (b) resultó positiva a CVA, siendo ambas sometidas a termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos, además, en todos los controles (T0) con resultados negativos fue posible detectar los virus, excepto en Regina que continuó entregando resultados negativos a todos los virus.

## DISCUSIÓN

Ante una industria frutícola cada vez más exigente y competitiva se vuelve esencial contar con plantas de buena calidad, con características genéticas y sanidad sobresalientes. Dentro de las enfermedades los virus constituyen un grupo importante, debido a que no existe un método para eliminarlos de las plantas y su principal vía de diseminación es mediante el material de propagación infectado (Herrera, 2014). Por lo tanto, el desarrollo de protocolos de saneamiento de virus que utilicen las técnicas de termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos podría ser una herramienta efectiva para disponer de material de propagación libre de virus.

En este estudio, los resultados del análisis de detección viral inicial mostraron la presencia de PNRSV en todas las muestras de cerezos. PNRSV es un virus ampliamente distribuido entre las especies del género *Prunus*. En viveros puede producir serias pérdidas cuando se utiliza material vegetal de plantas infectadas, reduciendo la germinación de la semilla y disminuyendo la brotación de yemas. En plantas adultas reduce el crecimiento (10% a 30%), rendimiento (20% a 60%) y retrasa la madurez (Hammond, 2011). Prospecciones realizadas en el país mostraron que PNRSV es uno de los virus más prevalentes en cerezos. Un estudio realizado en 5 viveros de cerezos localizados en la zona central de país, obtuvo una prevalencia de 10,9% de PNRSV y 9% de PDV utilizando como método de detección la prueba ELISA, pero es probable que los porcentajes hayan sido mayores si se hubiera utilizado una técnica más sensible en la detección (Herrera and Madariaga, 2002). Por otro lado, un estudio realizado en huertos de cerezos por Fiore *et al.* (2016), mostró una prevalencia de 32,4% de PDV y un 29,7% de PNRSV en cerezos utilizado en la mayoría de las muestras la hibridación molecular como método de detección. La alta prevalencia de PNRSV en cerezos, puede ser explicado por su amplia distribución, fácil diseminación a través de material de propagación y semillas, donde la tasa de transmisión por semillas fluctúa entre un 88,8% y 76,9% (Amari *et al.*, 2009; Hammond, 2011).

Al momento de iniciar la propagación del material infectado con virus, se observó que la principal causa de muerte en las fases de establecimiento y de multiplicación se debió a la presencia de agentes bacterianos, especialmente endófitos. Estos organismos compiten con los explantes por los nutrientes y componentes del medio de cultivo causando daños directos o indirectos (Leifert *et al.*, 1994). La presencia de endófitos en los genotipos Regina (b) y Colt (b) afectó negativamente el crecimiento y desarrollo de los explantes (en los primeros días se observó necrosis apical, y paulatinamente los explantes se tornaron color pardo y murieron). Adicionalmente, para lograr una introducción y establecimiento exitoso hay que tener en consideración la calidad del material de la planta donadora (García-González *et al.*, 2010). Para este estudio la calidad sanitaria del material vegetal inicial fue baja, debido a la necesidad de seleccionar ramillas infectadas por virus para la comprobación de la eficacia de los tratamientos. La presencia de PNRSV, PDV y ACLSV en Colt (b) habría causado la muerte de los explantes, debido al efecto sinérgico de estos tres virus y que se habría evidenciado en la sintomatología del material vegetal inicial (Cağlayan *et al.*, 2011; Hammond, 2011; Pallás *et al.*, 2012; Castro, 2020).

En algunos casos, los análisis virológicos en pre-saneamiento realizados tanto en el material inicial de propagación como en los explantes *in vitro*, no fueron coincidentes; hubo explantes sin detecciones y otros con detecciones de menos especies virales en relación a las encontradas en el material inicial, pese a que temperaturas cercanas a los 25°C y un activo crecimiento de los explantes durante el cultivo *in vitro* favorezcan la replicación viral (Hadidi *et al.*, 2011). Snir and Stein (1985) sugieren que aquellas fluctuaciones se pueden dar por una distribución irregular de los virus en los árboles, variando incluso dentro de una misma rama; por consiguiente, existe la posibilidad de que algunas ramillas utilizadas como material de introducción *in vitro* presentaran una distribución viral errática. En un estudio realizado por Deogratias *et al.* (1989b), tres variedades de cerezos cultivados *in vitro* e infectados con PNRSV y PDV, solo PNRSV y solo ACLSV, respectivamente, evidenciaron que la utilización de medios ricos en citoquininas, junto con una multiplicación intensiva, ayudarían a reducir drásticamente la carga viral y lograrían una putativa eliminación de los virus, ya que la tasa de división celular y síntesis proteica de la planta sería mayor que la de los virus. Por estas razones se vuelve esencial contar con técnicas de detección con alta sensibilidad para evitar la obtención de resultados falsos negativos.

Diversas experiencias han reportado la obtención de plantas libres de virus en frutales de carozos. La literatura menciona la combinación de diversas técnicas de saneamiento, basadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en conjunto con termoterapia, crioterapia y/o quimioterapia. (Gella and Errea, 1998; Manganaris *et al.*, 2003; Laimer *et al.*, 2006; Koubouris *et al.*, 2007; Paunovic *et al.*, 2007; Dziedzic, 2008; Křižan and Ondrušiková, 2009; Jakab-Ilyefalvi *et al.*, 2012; Seker *et al.*, 2015).

En este estudio, se evaluaron las técnicas de termoterapia, cultivo de ápices meristemáticos y la combinación de ambas técnicas para la eliminación de virus en dos portainjertos y una variedad de cerezo. Al momento de evaluar la supervivencia de los explantes al término de los tratamientos, la termoterapia obtuvo una mayor tasa de sobrevivencia que T2 y T3, y las diferencias entre estas últimas técnicas fueron mínima. Lo anterior, sugiere que el estrés generado por la escisión de ápices de meristemas de una longitud de 0,1 - 0,2 mm, tamaño mucho menor que los utilizados en los estudios de saneamiento de cerezos reportados en la literatura, favoreció a la eliminación de los virus pero provocó un mayor número de explantes muertos, y que la selección de la temperatura y duración del tratamiento logró asegurar una tasa de sobrevivencia mayor. Varios estudios han reportado que las variaciones en las tasas de sobrevivencia de los explantes sometidos a termoterapia y cultivo de ápices meristemáticos se puede deber a los diferentes grados de resistencia de las especies y/o genotipos a la alta temperatura, y la capacidad de regeneración de los meristemas en el medio de cultivo (Faccioli, 2001; Tan *et al.*, 2010; Panattoni *et al.*, 2013; Kazemi *et al.*, 2020). Deogratias *et al.* (1989a) evidenciaron que todos los explantes de cerezos ‘Noire de Meched’ infectados con ACLSV murieron al ser sometidos a un régimen térmico de 32-34°C por tres semanas, no obstante, en el mismo experimento el 30% de explantes de cerezos ‘Van 2D’ infectados con PDV y PNRSV lograron sobrevivir y sanearse. Por otro lado, Cieślińska (2007) indica que el 100% de los brotes de cerezo ‘Early Rivers’ infectados con PDV, el 80% de Myrobalan infectados con PNRSV y ACLSV y el 66,7% de ciruelo ‘Empress’

sobrevivieron al tratamiento térmico (36°C durante 4 semanas), pero solo en los dos últimos genotipos se obtuvieron clones libres de virus.

Cuando se evaluó la eficiencia en la eliminación de virus, Regina logró un alto número de explantes libres de virus. Algunos autores reportan que infecciones con solo un virus son más fáciles de eliminar (Knapp *et al.*, 1995; Paprstein *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015); por lo tanto, se recomienda realizar una selección sanitaria previa al saneamiento, lo que aumentaría el éxito en la eliminación de los virus. Manganaris *et al.* (2003), lograron eliminar el 82,4% de PNRSV y PPV en nectarino var. Arm King aplicando termoterapia en macetas y posterior escisión de explantes de ápices de meristemáticos (1,3 – 2,0 mm). Por otro lado, Křižan y Ondrušiková (2009), también obtuvieron un alto porcentaje de éxito en el saneamiento del durazno var. Leskora, eliminando PNRSV y PPV.

En la literatura no existen estudios sobre saneamiento de CVA y LChV-1. Pero sí existen estudios de saneamiento de *Apple stem grooving virus* (ASGV) que pertenece al género *Capillovirus* al igual CVA y *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3) que pertenece a la familia *Closteroviridae* al igual que LChV-1. Hu *et al.* (2012), obtuvieron el 33,3% de explantes de peral var. Jinshui No 2 libres de ASGV y ACLSV al someter los explantes a 35 ± 0,5 °C por 40 días y posterior escisión de meristemas de 0,5 mm. Pero al combinar la termoterapia, quimioterapia (25 µg mL<sup>-1</sup> ribavirina) y cultivo de ápices meristemáticos (1 mm) obtuvo una mayor tasa de regeneración y eficiencia de saneamiento; la ribavirina bloquea la replicación al inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y a la ARN replicasa viral (Quecini *et al.*, 2006). Panattoni and Triolo (2010), lograron eliminar GLRaV-1 y GLRaV-3 con una eficiencia de eliminación del 25,1% y un 24,7%, respectivamente, al someter los explantes a 37 °C durante 48 días. Pero al combinar el tratamiento térmico con ribavirina (15 µg mL<sup>-1</sup>) la eficiencia de eliminación de GLRaV-3 aumentó considerablemente al 93,3% en *Vitis champini* (Hu *et al.*, 2020).

Muchos de los estudios anteriores utilizaron un solo cultivar o genotipo para la erradicación del virus. La respuesta específica del genotipo a un virus es muy común en los estudios de erradicación de virus, y un protocolo puede funcionar bien en un genotipo dado, pero fallar completamente en otro. El desarrollo de protocolos aplicables a una amplia gama de genotipos dentro de una especie facilitaría la aplicación de la técnica, la producción de plantas libres de virus de distintos cultivares y la preservación del germoplasma vegetal (Wang *et al.*, 2018).

La elección del método de detección viral cumple un rol esencial para evaluar la eficiencia de los protocolos y técnicas de saneamiento. En la mayoría de los estudios anteriores, las detecciones se realizaron mediante la prueba de ELISA (Gella and Errea, 1998; Laimer *et al.*, 2006; Cieślińska, 2007; Paunovic *et al.*, 2007; Dziedzic 2008; Křižan and Ondrušiková, 2009; Seker *et al.*, 2015). Debido a una menor sensibilidad, los porcentajes de plantas libres de virus analizadas por ELISA tienden a ser mayores. En nuestro caso, a pesar de usar una técnica muy sensible, también hubo falsos negativos en el primer análisis post tratamiento. Basándose en estos datos, para garantizar el estado fitosanitario de las plantas regeneradas es

muy importante escoger una técnica capaz de detectar cargas virales bajas y realizar análisis virológicos cada año una vez aclimatadas en sustrato sólido.

Finalmente, en este estudio la combinación de la termoterapia asociada al cultivo de ápices meristemáticos (T3) ha demostrado ser un método sencillo y eficaz para la eliminación de virus en Colt, Maxma 14 y Regina propagados *in vitro*, incluso cuando se presentan infecciones dobles y triples. La eficiencia en la eliminación de los virus cuando se utiliza estas técnicas está relacionada con una correcta selección de la temperatura, duración del tratamiento y tamaño de los ápices meristemáticos (Faccioli, 2001; Wang and Valkonen, 2008; Tan *et al.*, 2010; Panattoni *et al.*, 2013). Además, hay que considerar la especie viral a eliminar y el genotipo de la planta (Youssef et al., 2009; Hu et al., 2018). Otros factores que influyen en la eficiencia son la capacidad y la experiencia del operador y las condiciones experimentales, especialmente cuando se realiza la escisión de los ápices meristemáticos (Hu *et al.*, 2020).



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que la termoterapia asociada a cultivo de explantes de ápices meristemáticos es un método eficaz y eficiente para la eliminación de virus que infectan a cerezos var. Regina y en los portainjertos Colt y Maxma 14. Además, el uso de técnicas de detección sensibles se vuelve esencial en apoyo al desarrollo de los protocolos de saneamiento.

Se ha logrado la escisión y regeneración de ápices meristemáticos de una longitud de 0,1 – 0,2 mm, valores menores que los reportados en la literatura, lo que ha garantizado un mayor éxito en el saneamiento.

Es importante aclimatar en sustrato sólido y volver a analizar periódicamente las plantas que *in vitro* han resultado negativas a los virus, con la finalidad de asegurar el mantenimiento del estado sanitario.

**LITERATURA CITADA**

Amari, K., L. Burgos, V. Pallás, and M. Sánchez-Pina. 2009. Vertical transmission of *Prunus necrotic ringspot virus*: hitch-hiking from gametes to seedling. *Journal of General Virology* 90:1767-1774.

Banco Central de Chile, 2018. Indicadores de comercio exterior cuarto trimestre 2018. Disponible en: <https://www.bcentral.cl/web/guest/-/indicadores-de-comercio-exterior-cuarto-trimestre-2018>. Consultado el 20 de Noviembre de 2019.

Bayati, S.H., M. Shams-Baksh, and A. Moieni. 2011. Elimination of the *Grapevine virus A* (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13:443-450.

Çağlayan, K., C. Ulubas-Serce, M. Gazel, and C. Varveri. 2011. *Prune dwarf virus*. pag 199-205. In: Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.) *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Castro, V. 2020. Saneamiento de virus y viroides en variedades de duraznero conservero (*Prunus persica* (L.) Batsch). 39 p. Tesis Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile.

Cieślińska, M. 2007. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 117-124.

Deogratias, J.M., F. Dosba, and A. Lutz. 1989a. Eradication of *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and *in vitro* culture. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11:337-342.

Deogratias, J.M., F. Dosba, and A. Lutz. 1989b. Eradication of *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, and *Apple chlorotic leaf spot virus* in tissue cultured sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11:332-336.

Driver, J.A., and A.H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. *HortScience* 19:507–509.

Druart, P. 2013. Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production, p. 119-136. In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM (Eds.). *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. Humana Press, New York.

- Dziedzic, E. 2008. Elimination of *Prunus necrotic ring spot virus* from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16:101-109.
- Faccioli, G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. p. 365-390. *In: Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Springer, Dordrecht.
- Fiore, N., C. Fernández, N. Quiroga, A.M. Pino, K. Salgado, and A. Zamorano. 2018. First report of *Little cherry virus-1* in Chile. *Plant Disease* 102(3): 689.
- Fiore, N., and A. Zamorano. 2013. First report of *Cherry green ring mottle virus* and *Cherry necrotic rusty mottle virus* in Sweet Cherry (*Prunus avium*) in Chile and South America. *Plant Disease* 97(8):1122-1123.
- Fiore, N., A. Zamorano, A.M. Pino, F. González, I.M. Rosales, J.A. Sánchez and V. Pallás. 2016. Survey of stone fruit viruses and viroids in Chile. *Journal of Plant Pathology* 98(3):631-635.
- Fuchs, M., G. Abawi, P. Marsella-Herrick, R. Cox, K.D. Cox, J.E. Carroll, and R.R. Martin. 2010. Occurrence of *Tomato ringspot virus* and *Tobacco ringspot virus* in highbush blueberry in New York State. *Journal of Plant Pathology* 92(2):451-459.
- García-González R., K. Quiroz, P. Caligari, and B. Carrasco. 2010. Plant tissue culture: Current status opportunities and challenges. *Revista Ciencia e Investigación Agraria* 37:5-30.
- Gella, R., and P. Errea, 1998. Application of *in vitro* therapy for *Ilarvirus* elimination in three *Prunus* species. *Journal of Phytopathology* 146(8-9):445-449.
- Hadidi, A. and M. Barba. 2011. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. p. 1-7. *In: Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.) Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Hadidi, A., M. Pasquini, M. Barba, S. Spiegel, A. Zaidi, and A. Crescenzi. 2011. Strategies for control of systemic pathogens of fruit trees – an overview. p. 373-375. *In: Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.) Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Hammond, R. W. 2011. *Prunus necrotic ringspot virus*. P. 207-213. *In: Hadidi, A., M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann (eds.) Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

- Herrera, G. 2014. Virus en carozos, pomáceas y vides: 40 años de estudios e investigaciones en Chile. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 289. 168p.
- Herrera, M. and V. Madariaga. 2002. Incidencia de *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Plum pox virus* (PPV) en viveros de frutales de carozo de la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 62(1):38-45.
- Holligs, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Annual Review of Phytopathology* 3: 367-396.
- Hu, G., Y. Dong, Z. Zhang, X. Fan, and F. Ren. 2020. Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae* 271:109462.
- Hu, G., Y. Dong, Z. Zhang, X. Fan, F. Ren, and Z. Li. 2018. Effect of pre-culture on virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy coupled with shoot tip culture. *Journal of Integrative Agriculture* 17(9):2015-2023.
- Hu, G., Y. Dong, Z. Zhang, X. Fan, F. Ren, and J. Zhou. 2015. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC) 121(2):435-443.
- Hu, G.J., N. Hong, L.P. Wang, H.J. Hu, and G.P. Wang. 2012. Efficacy of virus elimination from *in vitro* cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection* 37:20–25.
- Jakab-Ilyefalvi, Z., D. Pamfil, D. Clapa, and A. Fira. 2012. The effect of heat treatment and ‘*in vitro*’ chemotherapy mediated by 2-Thiouracil on *Plum pox virus* (PPV) content in meristem regenerated plum plants. *Annals of Romanian Society for Cell Biology* 17:101-110.
- Kazemi, N., F. Z. Nahandi, A. A. Habashi, and F. Masoomi-Aladizgeh. 2020. Comparing the efficiency of conventional and novel methods of virus elimination using molecular techniques. *European Journal of Plant Pathology* 157(4):887-897.
- Knapp, E., V. Hanzer, H. Weiss, A. Da Camara Machado, B. Weiss, Q. Wang, H. Katinger, and M. Da Camara Machado. 1995. New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Horticulturae* 386:409-418.
- Koubouris, G., V. Maliogka, K. Efthimiou, N. Katis, and M. Vasilakakis. 2007. Elimination of *Plum pox virus* through *in vitro* thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. *Journal of General Plant Pathology* 73(5):370-373.

Křižan, B., and E. Ondrušiková. 2009. Thermotherapy of apricot cultivars. *Acta Horticulturae* 839:269–274.

Laimer, M., V. Hanzer, D. Mendonça, E. Kriston, E. K. Toth, Z. Kirilla, and I. Balla. 2006. Elimination and detection of pathogens from tissue cultures of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae* 725(1):319.

Latorre, B: 2008. Cerezos saludables. *Revista Agronomía y Forestal* UC 34:8-9.

Leifert, C., C. E. Morris, and M. W. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: Reasons for contamination problems *In Vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(2):139-183.

MacKenzie, D., M. McLean, S. Mukerji, and M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222–226.

Malinovski, T. 1997. Silicacapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SCRT-PCR): Application for the detection of several plant viruses. p 444-448. In: H.W. Dehne (Eds): *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Manganaris, G., A. Economou, S. Boubourakas, and I. Katis. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports* 22(3):195-200.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.

ODEPA. 2015. Cerezas: frutas en expansión. Disponible en: [http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/1438959089Cerezas201507.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1438959089Cerezas201507.pdf). Consultado 20 de Noviembre de 2019.

ODEPA. 2020. Superficie plantada nacional, regional, número de huertos e infraestructura frutícola. Disponible en: [https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2020/11/cultivosRegional\\_30.10.20.xls](https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2020/11/cultivosRegional_30.10.20.xls). Consultado 20 de Noviembre de 2020.

Pallás, V., F. Aparicio, M. C. Herranz, K. Amari, M. A. Sanchez-Pina, and A. Myrta. 2012. Ilarviruses of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees. *Phytopathology* 102:1108–1120.

Panattoni, A., A. Luvisi, and E. Triolo. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11(1):173-188.

- Panattoni A, and E. Triolo. 2010. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on *in vitro* collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae* 125:63-67.
- Paunovic, S., D. Ruzic, T. Vujovic, S. Milenkovic, and D. Ievremovic. 2007. *In vitro* production of *Plum pox virus* - Free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 21(4):417-421.
- Papstein, F., J. Sedlak, J. Polak, L. Svobodova, M. Hassan, and M. Bryxiova. 2008. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94(3):347-352.
- Quecini, V., M. L. Lopes, F. T. Pacheco, and M. D. Ongarelli. 2006. Ribavirin, a guanosin analogue mammalian antiviral agent, impairs *Tomato spotted wilt virus* multiplication in tobacco cell cultures. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41:1-13.
- Rivera, L., A. Zamorano, and N. Fiore. 2016. Genetic divergence of *Tomato ringspot virus*. *Archives of Virology* 161(5):1395-1399.
- Rott, M.E., and W. Jelkmann. 2001. Complete nucleotide sequence of *Cherry necrotic rusty mottle virus*. *Archives of Virology* 146:395-401.
- Seker, M., V. Süzerer, I. O. Elibuyuk, and Y. Özden. 2015. *In Vitro* elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy. *International Journal of Agriculture and Biology* 17(5): 1066-1070.
- Snir, I., and S. Stein. 1985. *In vitro* detection and elimination of *Prunus necrotic ring spot virus* in sweet cherry (*Prunus avium*). *Rivista di Ortoflorofrutticoltura italiana* 69:191-194.
- Spiegel, S., E.A. Frison, and R.H. Converse. 1993. Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movements of clonal plant germ plasm. *Plant Disease* 77:176-1180.
- Takebe, I., C. Labib, and G. Melchers. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58:318–320.
- Tan, R., L. Wang, N. Hong, and G. Wang. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101(2):229-235.
- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.
- Wang, Q., W. Cuellar, M.L. Rajamäki, Y. Hirata, and J. Valkonen. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: Relation of virus distribution,

subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9(2):237-250.

Wang, Q., and J. Valkonen. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods* 154(1-2):135-145.

Wang, M., Z. Cui, J. Li, X. Hao, L. Zhao, and Q. Wang. 2018. *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods* 14: 1-18.

Youssef, S. A., M. Al-Dhaher, and A. Shalaby. 2009. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leaf roll-associated virus-1* (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *International Journal Virology* 5:89-99.

Zamorano A, M. Chiumenti, C. Fernández, N. Quiroga, A.M.Pino, K. Sagredo, P. Saldarelli, and Fiore N. 2017. First report of *Cherry virus A* and *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* in cherry in Chile. *Plant Disease* 101(9):168.

## ANEXO 1

Componentes de los medios de cultivos utilizados en la etapa de introducción *in vitro*.

	Driver & Kuniyuki, 1984	Murashige & Skoog, 1962
Macroelementos (g/L)		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,4	1,65
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,560	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,265	0,17
MgSO <sub>4</sub>	0,74	0,37
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	150	0,432
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,970	-
KNO <sub>3</sub>	-	0,19
Microelementos (mg/L)		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	6,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	33,5	16,9
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	17,0	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,4	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	-	0,025
KI	-	0,83
Quelato de hierro (mg/L)		
Na <sub>2</sub> ·EDTA	50	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·x 7H <sub>2</sub> O	55	27,8
Secuestrene	100	-
Vitaminas (mg/L)		
Piridoxina HCL	0,5	0,5
Tiamina HCL	1	0,1
Glicina	2	2
Acido Nicotínico	0,5	0,5
Myo-Inositol	100	100
Ac. Ascórbico	10	-
Ac. Cítrico	10	-
Reguladores de crecimiento (mg/L)		
BAP	0,6	0,5
ANA	0,01	0,01
Otros (g/L)		
Sacarosa	30	20
Agar	7	7



## ANEXO 2

Componentes de los medios de cultivos utilizados en la etapa de multiplicación *in vitro*.

	Driver & Kuniyuki, 1984	Murashige & Skoog, 1962
Macroelementos (g/L)		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,4	1,65
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,560	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,265	0,17
MgSO <sub>4</sub>	0,74	0,37
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	150	0,432
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,970	-
KNO <sub>3</sub>	-	0,19
Microelementos (mg/L)		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	6,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	33,5	16,9
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	17,0	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,4	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	-	0,025
KI	-	0,83
Quelato de hierro (mg/L)		
Na <sub>2</sub> ·EDTA	50	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·x 7H <sub>2</sub> O	55	27,8
Secuestrene	100	-
Vitaminas (mg/L)		
Piridoxina HCL	0,5	0,5
Tiamina HCL	1	0,1
Glicina	2	2
Acido Nicotínico	0,5	0,5
Myo-Inositol	100	100
Ac. Ascórbico	10	-
Ac. Cítrico	10	-
Reguladores de crecimiento (mg/L)		
BAP	0,6	0,5
ANA	0,01	0,01
AG <sub>3</sub>	0,1	0,1
Otros (g/L)		
Sacarosa	30	20
Agar	7	7

## ANEXO 3

Componentes de los medios de cultivos utilizados para el cultivo de ápices meristemáticos.

Druart, 2013	
Macroelementos (g/L)	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,825
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,082
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,185
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,22
KNO <sub>3</sub>	0,925
Microelementos (mg/L)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	25
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
Quelato de hierro (mg/L)	
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·x 7H <sub>2</sub> O	27,8
Vitaminas (mg/L)	
Tiamina HCL	1
Pantotenato Ca	0,5
Biotina	0,1
Myo-Inositol	500
Rivoflavina	0,1
Ac. 4 aminobenzoico	1
Ac. Nicotínico	1
Ac. Fólico	0,01
Reguladores de crecimiento (mg/L)	
BAP	1
AG <sub>3</sub>	0,1
ANA	0,01
Otros (g/L)	
Caseína hidrolizada	0,1
Sacarosa	20
Agar	7

## APÉNDICE I

Análisis virológico mediante RT-PCR de los explantes *in vitro* seleccionados para conformar las líneas madres y número de explantes obtenidos luego su multiplicación (solo aquellas líneas que con detecciones más uniformes).

Genotipo	Línea	Virus	Nº de explante al 1º repique	Nº de explante al 2º repique	Nº de explante al 3º repique
Maxma 14 (a)*	1	CVA	3	7	9
	2	CVA	3	9	14
	3	CVA	3	5	7
	4	CVA, PNRSV	1	-	-
	5	CVA	5	4	5
	6	CVA, PNRSV	1	-	-
	7	CVA	2	2	8
	8	CVA	2	3	3
	9	CVA	2	0	0
	10	CVA	3	2	2
	11	CVA	2	3	0
	12	CVA	2	2	5
	13	CVA	1	1	4
	14	CVA	3	2	4
	15	CVA	1	0	0
	16	CVA	2	2	4
Total			32	39	69

\* Para Maxma 14 (a) se seleccionaron aquellas líneas positivas a CVA.

Genotipo	Línea	Virus	Nº de explantes al 1º repique	Nº de explantes al 2º repique	Nº de explantes al 3º repique	Nº de explantes al 4º repique
Maxma 14 (b)*	1	PNRSV, CVA, LChV-1	1	3	2	1
	2	PNRSV, CVA, LChV-1	1	4	10	15
	3	PNRSV, CVA, LChV-1	1	4	6	10
	4	PNRSV, CVA, LChV-1	1	10	17	20
	5	PNRSV, CVA, LChV-1	1	9	13	19
Total			5	30	48	65

\* Para Maxma 14 (b) se seleccionaron aquellas líneas positivas a PNRSV, CVA y LChV-1.

Genotipo	Línea	Virus	N° de explantes al 1° repique	N° de explantes al 2° repique	N° de explantes al 3° repique	N° de explantes al 4° repique
Colt (a)*	1	PNRSV, CVA	2	5	2	8
	2	PNRSV, CVA	1	3	10	18
	3	PNRSV, CVA	4	3	2	7
	4	PNRSV, CVA	2	4	5	11
	5	PNRSV	2	-	-	-
	6	PNRSV, CVA	1	1	0	0
	7	PNRSV, CVA	2	-	-	-
	8	PNRSV, CVA	2	6	1	1
	9	PNRSV, CVA	1	2	4	2
	10	PNRSV, CVA	1	1	1	0
	11	PNRSV, CVA	1	1	2	0
	12	PNRSV, CVA	1	2	9	14
	13	PNRSV, CVA	4	6	6	1
	14	PNRSV, CVA	3	3	0	1
Total			27	37	42	63

\* Para Colt (a) se seleccionaron aquellas líneas positivas a PNRSV y CVA.

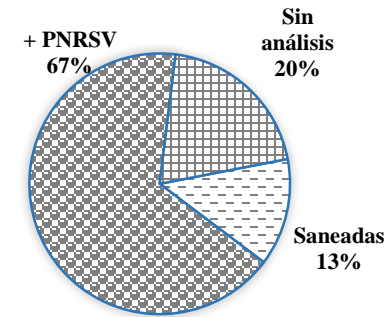
Genotipo	Línea	Virus	N° de explantes al 1° repique	N° de explantes al 2° repique	N° de explantes al 3° repique	N° de explantes al 4° repique
Regina*	1	NEG	3	-	-	-
	2	PNRSV	1	8	12	17
	3	PNRSV	2	4	12	15
	4	NEG	4	-	-	-
	5	NEG	2	-	-	-
	6	PNRSV	2	5	8	14
	7	NEG	2	-	-	-
	8	NEG	3	-	-	-
	9	NEG	3	-	-	-
	10	NEG	4	-	-	-
	11	NEG	3	-	-	-
	12	NEG	6	-	-	-
	13	PNRSV	3	6	10	16
	14	NEG	3	-	-	-
	15	NEG	3	-	-	-
	16	NEG	1	-	-	-
Total			50	23	42	62

\* Para Regina (a) se seleccionaron aquellas líneas positivas a PNRSV.

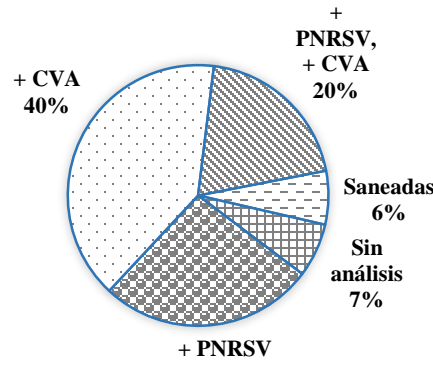
APÉNDICE II

Porcentajes de explantes saneados, con infecciones triples, dobles y simples, y sin analizar debido a que murieron durante el proceso de saneamiento.

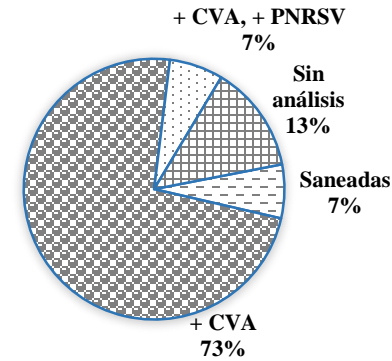
**Termoterapia (T1)**



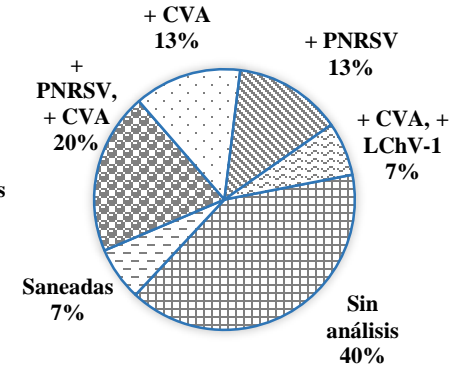
Regina (a)



Colt (a)

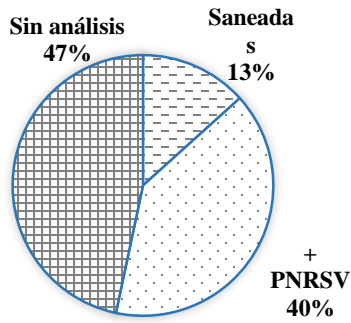


Maxma (a)

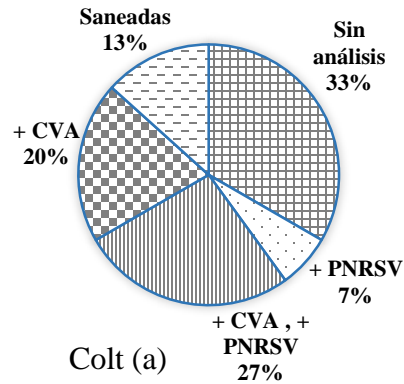


Maxma (b)

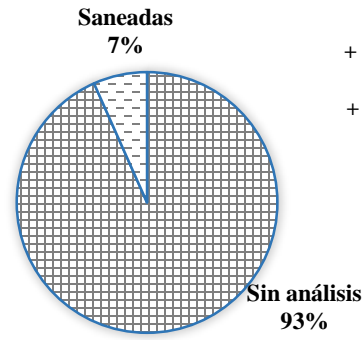
**Cultivo de explantes de ápices meristemáticos (T2)**



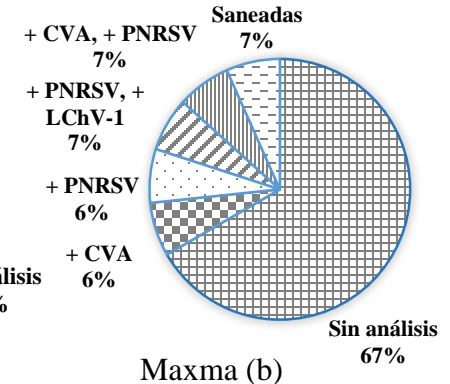
Regina (a)



Colt (a)



Maxma (a)



Maxma (b)

**Termoterapia asociada a cultivo de explantes de ápices meristemáticos (T3)**

