

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Evaluación de termoterapia y crioterapia para la eliminación de virus en

Andimora (*Rubus glaucus*)

VIDA-408

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Bianka Michelle Mendoza Egas

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mis padres, Rosa y Hector, por inculcarme desde niña la importancia de la educación y otorgarme su apoyo incondicional. A mi hermana Arianna, por ser mi compañera y mi fortaleza durante toda la carrera. A mi tutor, el Ph D. Diego Quito-Ávila, por abrir las puertas de su laboratorio, por ser un guía y su confianza en mis habilidades.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi familia, Rosa, Hector, Arianna y Cecibel, por su apoyo inquebrantable, por inspirarme a confiar en mí y motivarme a alcanzar mis metas.

A mis amigas Melissa, Inés, Romina, Samantha y Estefanía, por acompañarme y crecer a mi lado, por cada nueva etapa que iniciamos juntas.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, por el conocimiento impartido y las oportunidades otorgadas. A todo el equipo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y el Laboratorio de Virología Molecular, por enseñarme las habilidades necesarias para realizar este proyecto y por su acompañamiento hasta su culminación.

Declaración Expresa

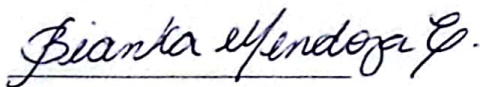
Yo BIANKA MICHELLE MENDOZA EGAS acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 15 de junio del 2025.



Autor

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Diego Fernando Quito Ávila

Tutor de proyecto

Resumen

La producción de Andimora (*Rubus glaucus*) es una actividad de gran relevancia económica en Ecuador; sin embargo, la transmisión de virus como Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) y Rose Ilarvirus 2 (RIV-2) compromete el rendimiento y la calidad del cultivo. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la termoterapia y la crioterapia, aplicadas de forma individual y combinada, como método de eliminación viral, con el fin de generar material vegetal certificado libre de virus. Se utilizaron semillas de Andimora, las cuales fueron germinadas en condiciones de cultivo *in vitro* estándar. Los explantes se sometieron a termoterapia (38 °C a 26 °C , durante 21 días) y, en el tratamiento combinado, a crioterapia mediante exposición a nitrógeno líquido. La supervivencia fue del 100 % en el grupo control, 6,67 % con termoterapia y 6,89 % en el tratamiento combinado, donde se observó regeneración (5,17 %). El análisis por RT-PCR confirmó la presencia de RBDV y RIV-2 en el control, mientras que la detección en los tratamientos quedó pendiente por el tamaño reducido del tejido regenerado. Se concluye que la combinación de crioterapia y termoterapia permite la supervivencia de meristemos con capacidad regenerativa, lo que representa una estrategia prometedora para la obtención de líneas libres de virus.

Palabras clave: termoterapia, crioterapia, *Rubus glaucus*, eliminación viral

Abstract

The production of Andimora (Rubus glaucus) is a highly relevant agricultural activity in Ecuador; however, the transmission of viruses such as Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) and Rose Ilarvirus 2 (RIV-2) compromises crop yield and quality. This project aimed to evaluate the effectiveness of thermotherapy and cryotherapy, applied individually and combined, as viral elimination methods to produce certified virus-free plant material. Seeds of the Andimora variety were germinated under standard in vitro culture conditions. Explants were subjected to thermotherapy (38 °C to 26 °C for 21 days) and, in the combined treatment, to cryotherapy through exposure to liquid nitrogen. Survival was 100% in the control group, 6.67% with thermotherapy, and 6.89% in the combined treatment, where regeneration was observed (5.17%). RT-PCR analysis confirmed the presence of RBDV and RIV-2 in the control group, while detection in treated explants remained pending due to the reduced size of regenerated tissue. It is concluded that the combination of cryotherapy and thermotherapy enables the survival of meristems with regenerative capacity, representing a promising strategy for obtaining virus-free lines.

Keywords: *thermotherapy, cryotherapy, Rubus glaucus, virus elimination*

Índice general

Evaluadores	V
Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	V
Simbología	VI
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VII
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción	2
1.2 Descripción del Problema	3
1.3 Justificación del problema	4
1.4 Objetivos	4
<i>1.4.1 Objetivo general</i>	4
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i>	5
1.5 Marco teórico	5
1.5.1 Sistema de producción de mora en Ecuador	5
1.5.2 Virus que afectan al cultivo de la mora	6
1.5.3 Esquemas de propagación de plantas de mora certificadas libres de virus.....	7
Capítulo 2.....	11
2. Metodología.....	12
2.1 Material vegetal	12
2.2 Medios de cultivo utilizados para la termoterapia y crioterapia	12
2.3 Termoterapia	13

2.4	Crioterapia	14
2.5	Diseño experimental.....	15
2.6	Diagnóstico mediante RT-PCR	15
Capítulo 3.....		17
3. Resultados y análisis		18
3.2	Diagnóstico viral.....	21
Capítulo 4.....		25
4.1	Conclusiones y recomendaciones	26
4.1.1	<i>Conclusiones</i>	26
4.1.2	<i>Recomendaciones</i>	26
Referencias.....		28

Abreviaturas

AG	Acido Gibelerico
BAP	6-B+bencilaminopurina
BM	Basal media
EM	Elongation media
IBA	Indol-3-butiric acid
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
LS	Loading solution
MS	Mushirage y Skoog
PCM	Pre-culture media
PSV2	Plant vitrification solution 2
RBDV	Raspberry bushy dwarf virus
RegM	Regeneration media
RIV-2	Rose ilarvirus 2
RM	Recovery media
RS	Recovery solution
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SNSV	Strawberry Necrotic Shock Virus

Simbología

μL	Microlitro
cm	Centímetro
mg	Miligramo
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo
pH	Potencial de Hidrógeno

Índice de figuras

<i>Figura 1 Grupo control en cultivo in vitro</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2 Formación de callos después del tratamiento de termoterapia.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3 Regeneración de los meristemas después del tratamiento combinado de termoterapia y crioterapia</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4 Resultados de la detección por RT-PCR en el grupo control</i>	<i>23</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Descripción de los cebadores utilizados en el ensayo PCR</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2 Porcentaje de supervivencia y regeneración según el tratamiento aplicado</i>	<i>18</i>

Capítulo 1

1.1 Introducción

La mora y otras especies del género *Rubus*, como la frambuesa, tienen importancia comercial en países andinos. La especie *Rubus glaucus benth*, conocida como "Mora de Castilla" o mora andina, es predominante en la región y se cultiva en países como Ecuador, Perú, Colombia, Chile, Panamá, México y Estados Unidos (Martínez et al., 2019). En Ecuador, la provincia de Tungurahua concentra la mayor parte del cultivo comercial de mora, produciendo aproximadamente 7,098 toneladas anuales en 868 hectáreas. En todo el país se reportan 5,000 hectáreas de mora de diferentes cultivares, incluyendo la mora castilla y una variedad de *Rubus glaucus* comúnmente conocida como "Colombiana" (Cifuentes et al., 2025). Estos genotipos son tradicionalmente cultivados por productores pequeños y medianos, siendo una actividad de comercio familiar (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2024).

En mayo de 2013, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) liberó un nuevo cultivar de mora de castilla llamado INIAP ANDIMORA-2013 mediante el Programa Nacional de Fruticultura (Martínez et al., 2013). Esta variedad es una mutación somática de la tradicional mora de castilla caracterizada por no tener espinas, además de producir frutos de mayor calidad. Estas plantas fueron multiplicadas y distribuidas en varias localidades de Tungurahua y mostraron una gran aceptación por parte de los productores locales.

Las especies comerciales de *Rubus* como *R. glaucus* se multiplican de forma vegetativa, lo que las expone a infecciones virales durante su propagación y desarrollo, disminuyendo la producción y calidad de su fruto (Martín et al., 2013). En Ecuador se han detectado tres virus prevalentes en el viroma de la variedades de mora nacionales: virus del enanismo arbustivo de la frambuesa (RBDV), virus del choque necrótico de la fresa (SNSV) y el ilarvirus 2 de la rosa

(RIV-2) (Cifuentes et al., 2025). En Andimora se reportó la presencia de RBDV y RIV-2, detectándose RIV-2 únicamente en infecciones mixtas con RBDV.

RBDV es un virus de gran importancia económica para la producción de *Rubus*, debido a su distribución global. Se puede transferir horizontalmente a través del polen y es capaz de infectar células meristemales, lo que lo vuelve difícil de erradicar por métodos convencionales (Wang et al., 2018). RIV-2 fue recientemente reportado por primera vez en cultivos de rosa en Taiwán en 2022, y recientemente en muestras de Andimora en Ecuador. Este virus pertenece a la familia *Bromoviridae* y también es transmitido por polen; sin embargo, no existe información sobre su potencial efecto en plantas de Andimora (Cifuentes et al., 2025). Debido a la presencia de estas infecciones y a que no existe un sistema estandarizado de detección de virus en el país, es imprescindible establecer material vegetal libre de virus para uso comercial.

1.2 Descripción del Problema

La producción de mora en Ecuador juega un papel fundamental en la economía de pequeños y medianos productores, quienes dependen de este cultivo para su sustento económico. Sin embargo, enfrenta grandes desafíos debido a la transmisión de enfermedades virales durante su proceso de multiplicación y producción. La falta de herramientas de diagnóstico y estrategias de eliminación adecuadas para virus como RBDV y RIV-2 permite que estas enfermedades se propaguen en el material vegetal utilizado en el comercio local. La propagación de enfermedades virales en los cultivos de mora representa una amenaza significativa para todo el sector productivo, afectando no solo la calidad y cantidad de la producción, sino también la estabilidad económica y social de las comunas rurales que dependen de este cultivo. Los síntomas causados por infecciones virales, como la deformación de los frutos y la reducción de su tamaño, afectan directamente la calidad del producto final,

disminuyendo su valor comercial. La identificación e implementación de métodos efectivos para la eliminación de virus es crucial para garantizar la sostenibilidad del cultivo de mora, mejorar la competitividad del sector y garantizar la seguridad económica de los productores locales. Un estudio reciente reportó que RBDV, uno de los principales virus de mora y frambuesa a nivel mundial, fue detectado en 100% de muestras de Andimora provenientes tanto de campo como de centros de propagación de plantas (e.g. vivero y laboratorio). Este hallazgo ha generado alertas en el sector, enfatizando la necesidad de contar con un sistema de producción de plantas de mora certificadas libres de virus.

1.3 Justificación del problema

La eliminación de virus como RBDV y RIV-2 desde el sistema de propagación masiva de Andimora es crucial para la sostenibilidad comercial del cultivo. Los métodos convencionales de eliminación de virus han demostrado ser insuficientes para abordar eficazmente estas infecciones, lo que destaca la necesidad de implementar nuevas tecnologías de diagnóstico y tratamiento. A través de métodos como la termoterapia y crioterapia se busca generar una línea de “plantas madre” certificadas libres de virus para su multiplicación comercial a nivel nacional. Esto, a su vez, proporcionará un referente para abordar infecciones virales que afecten a otros cultivos de interés comercial en el país, promoviendo prácticas de producción agrícola más sostenibles y aumentando la seguridad alimentaria del país.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de la eliminación de los virus RBDV y RIV-2 en mora andina (*Rubus glaucus*) mediante tratamientos de termoterapia y crioterapia *in vitro* para la mejora de la calidad y rendimiento del cultivo.

1.4.2 Objetivos específicos

- Implementar tratamientos de termoterapia y crioterapia en brotes de crecimiento de Andimora *in vitro* para la eliminación de RBDV y RIV-2.
- Determinar el impacto de estos tratamientos sobre la regeneración y supervivencia de los brotes mediante evaluaciones de crecimiento y multiplicación

1.5 Marco teórico

1.5.1 Sistema de producción de mora en Ecuador

En Ecuador, la producción de mora se concentra principalmente en regiones ubicadas en la región Sierra, como lo son las provincias de Tungurahua, Carchi, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha e Imbabura (Barrera et al., 2017). Estas zonas presentan condiciones climáticas, entre ellas la altitud, temperaturas templadas y una adecuada disponibilidad de agua, que favorecen su producción y desarrollo a lo largo del año.

El sistema de producción de mora se caracteriza por el establecimiento de cultivos perennes, los cuales se pueden mantener durante varios años (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2013). Su propagación se realiza de forma asexual, usualmente mediante esquejes o acodos, permitiendo conservar las características genéticas de la planta madre. Por otra parte, la cosecha es de tipo escalonada y se efectúa varias veces semanalmente debido a la floración y fructificación del cultivo. Su mantenimiento requiere de cuidados regulares, siendo el control de malezas y la poda de suma importancia. Aquello se realiza tres veces en la producción de la mora, la primera es durante la formación, luego en el mantenimiento (realizándose cada dos semanas o cada mes) y finalmente en la renovación, cuando la planta deja de producir frutos (Allauca, 2024).

1.5.2 Virus que afectan al cultivo de la mora

Las especies de *Rubus* son afectadas por más de 30 virus a nivel mundial, lo que impacta significativamente la producción agrícola. Estos virus se transmiten a través de áfidos, nemátodos y polen, y suelen causar enfermedades en infecciones mixtas. Los síntomas incluyen reducción del rendimiento, retraso en el crecimiento, moteado y distorsión de las hojas, amarillamiento de las nervaduras y muerte (Martin et al., 2013).

Entre los más importantes se encuentra el virus del enanismo arbustivo de la frambuesa (RBDV) es el único dentro del género *Idaeovirus* (Mayoviridae), perteneciendo a la familia *Bromoviridae*. Este patógeno infecta principalmente especies del género *Rubus* a nivel mundial (Kadriye Çağlayan et al., 2023). Su genoma está constituido de dos segmentos de ARN monocatenario de sentido positivo (Quito-Avila et al., 2014). Este virus se transmite a través de polen y semillas. Su nombre se deriva de los síntomas registrados en lo que ahora se sabe son infecciones mixtas con el virus de la necrosis de la frambuesa negra (BRNV) en frambuesas, dónde está asociado a enanismo, clorosis y desarrollo de frutas desmenuzables, lo que disminuye la producción. A pesar de esto, varios cultivares de *Rubus* pueden no mostrar síntomas de infección. En Norte y Sudamérica se han reportado infecciones por RBDV en cultivos silvestres y comerciales de frambuesa roja, frambuesa negra, zarzamoras, y en variedades de mora, incluyendo la Andimora (Martin & Tzanetakis, 2015; Cifuentes et al., 2025). Debido a su transmisión mediante polen, la resistencia a RBDV de ciertos cultivares de *Rubus* es uno de los ejemplos de resistencia viral más estudiados el único método de control efectivo, y es asociada con un gen de resistencia dominante, el cual parece estar asociado a características negativas, ya que los cruces seleccionados entre plantas susceptibles y resistentes a RBDV raramente conservan esta resistencia (Martin et al., 2013). Además, la aparición de la cepa (R-15) capaz de romper esta resistencia viral lo que destaca la importancia de aplicar nuevas estrategias para la producción de plantas libres de RBDV.

El virus rose ilarvirus 2 (RIV-2) pertenece al género *Ilarvirus*, de la familia *Bromoviridae* y posee un genoma de ARN tripartito de cadena positiva. Fue reportado por primera vez en 2022 en cultivos de rosa en Taiwán (Chen et al., 2022) y en cultivos de mora en Ecuador en 2025 (Cifuentes et al., 2025). La mayoría de los *Ilarvirus* tienen una amplia gama de hospederos y causan enfermedades en cultivos económicamente significativos como *Citrus*, *Prunus*, *Rosa* y *Rubus*, en los cuales afectan el crecimiento, producción y maduración de frutos. El RIV-2 se transmite a través del polen y se puede expandir rápidamente en grandes extensiones de cultivos. Por lo tanto, la mejor manera de prevenir los daños causados por su infección es el uso de material vegetal libre de virus para su propagación (Untiveros et al., 2010).

En los cultivos de bayas como la mora, la propagación clonal permite la transmisión de estos virus desde las plantas madres al nuevo material. Es esencial implementar programas de detección y erradicación de virus para obtener plantas libres de patógenos, que luego se certifican para asegurar alta productividad y vigor en los campos comerciales (Wang et al., 2018). Sin embargo, el acceso a estos protocolos es limitado para los productores rurales con menos tecnificación, lo que facilita la transmisión de patógenos en sus cultivos.

1.5.3 Esquemas de propagación de plantas de mora certificadas libres de virus

Iniciar la producción de fruta con materiales libres de virus es crucial para asegurar la productividad y la longevidad óptimas de las plantas. El uso de plantas certificadas libres de virus reduce el riesgo de introducir patógenos en el cultivo, lo que puede aumentar los costos de producción y de gestión de vectores (Quito-Avila et al., 2014). Además, estas poseen una mayor capacidad de establecimiento y rendimiento en comparación con las infectadas. Incluso si plantas infectadas con virus parecen sanas en un vivero, el estrés del transporte y la

replantación puede agravar su condición, provocando un establecimiento deficiente (Martin & Tzanetakis, 2015).

El proceso de certificación de material vegetal libre de virus comienza con el desarrollo de plantas de Generación 1 (G1) a partir del material más sano disponible. Estas plantas se someten a pruebas rigurosas para detectar patógenos específicos, utilizando métodos moleculares, inmunológicos y bioquímicos. Si se detecta alguna infección, se aplican terapias térmicas, químicas o criogénicas, seguidas de cultivo de ápices de meristemas. Las plantas regeneradas después de los tratamientos se vuelven a probar y, si están libres de virus, se designan como G1. Estas plantas sirven como base para las generaciones posteriores, que también se someten a pruebas regulares para asegurar su sanidad antes de ser vendidas a los productores (Martin & Tzanetakis, 2015).

1.5.3.1 Termoterapia

Las técnicas más exitosas para la generación de plantas madre libres de virus son aquellas basadas en el cultivo *in vitro*, como el cultivo de meristemas, microinjertos, termoterapia, crioterapia y quimioterapia. Estas técnicas son más efectivas cuando se combinan entre ellas, especialmente con la termoterapia, que al ser aplicadas individualmente. Los métodos basados en termoterapia consisten en tratar las plantas de cultivo *in vitro* con ciclos de calor, ya que la exposición al calor ralentiza la movilización de virus hacia el meristemo apical. Posteriormente, las plantas se pueden someter a tratamientos adicionales, como la crioterapia. Los ciclos de termoterapia generalmente abarcan una duración de 2 a 6 semanas, con temperaturas de 35 a 42°C, dependiendo de la especie vegetal y el virus objetivo (Wang, Cui, et al., 2018). Aunque una mayor temperatura y un tiempo de exposición prolongado aumentan la eficiencia en la eliminación de virus, esto puede afectar negativamente la tasa de regeneración y supervivencia de las plantas. Por lo tanto, es crucial

definir un rango de tratamiento adecuado. En el caso de RBDV en *Rubus*, la aplicación única de termoterapia no ha demostrado ser suficiente para la eliminación del virus; sin embargo, la combinación con crioterapia ha mostrado mejores resultados (Wang et al., 2008).

1.5.3.2 Crioterapia

La crioterapia de puntas de brote, conocida como *shoot tip cryotherapy*, es el tratamiento de material vegetal infectado en nitrógeno líquido durante cortos periodos de tiempo para eliminar patógenos. Este proceso, basado en métodos de crioconservación, es más efectivo y reproducible que métodos tradicionales como el cultivo de meristemos. Los beneficios de esta técnica incluyen una alta frecuencia de eliminación de patógenos, y un mayor tamaño de material vegetal necesario para la eliminación de virus, en comparación a técnicas como el cultivo de meristemos, lo que reduce las dificultades en la excisión de los brotes y el tiempo de trabajo requerido (Wang et al., 2018).

La distribución desigual del virus dentro de la planta es base para el éxito de esta técnica. Mientras más cerca del meristemo apical de la punta de brote, menor es la carga viral, lo que puede resultar en áreas con un título viral muy bajo o libres de virus. Al sumergir los brotes en nitrógeno líquido, sólo las células de la parte superior del meristemo apical sobreviven, mientras que las de la parte inferior mueren. Esto significa que las plantas regeneradas a partir de brotes tratados con nitrógeno líquido podrían estar libres de virus, especialmente aquellos que no infectan tejidos meristemáticos. Sin embargo, la combinación de termoterapia seguida de crioterapia ha demostrado ser efectiva para la eliminación de virus difíciles de erradicar, como el Virus de la madera asurcada del manzano (ASGV), con una frecuencia de eliminación del 30-100% en cuatro cultivares de manzana (Zhao et al., 2018) y del 30-45% de RBDV en cultivos de frambuesa (*Rubus idaeus*) (Wang et al., 2008).

En general, este proceso inicia con la introducción de plantas infectadas en cultivo *in vitro*, seguido de la escisión de puntas de brote, preparación para la deshidratación y

congelamiento en el nitrógeno líquido mediante una exposición gradual a medios con alta concentración de sacarosa, exposición al nitrógeno líquido y post-cultivo para la regeneración, finalmente las plantas sobrevivientes son transferidas a invernaderos para evaluar su desarrollo y diagnóstico mediante pruebas de detección viral (Wang et al., 2018).

Capítulo 2

2. Metodología.

2.1 Material vegetal

En 2024, se realizó un muestreo de cultivos de la variedad Andimora en las provincias de Pichincha y Tungurahua. Se obtuvo muestras de frutos de la localidad de Píllaro, de los cuales se extrajo las semillas para ser sometidas a un proceso de escarificación antes de su establecimiento en cultivo *in vitro*. Las semillas fueron lavadas con detergente neutro y colocadas en tubos de 15 ml cubiertas de sacarosa durante 24 horas. Posteriormente, fueron lavadas nuevamente y se dejaron secar durante la noche. Luego, las semillas se colocaron en ácido sulfúrico al 98% durante media hora y se dejaron secar.

Las semillas escarificadas fueron sembradas en cultivo *in vitro* siguiendo el siguiente protocolo de desinfección: las semillas se lavaron durante 2 minutos en alcohol, luego durante 20 minutos en una solución de cloro y Tween 20. Posteriormente, se realizaron enjuagues con agua esterilizada hasta eliminar las burbujas. Finalmente, las semillas se introdujeron en placas con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) hasta germinar. Una vez germinadas las semillas se mantuvieron en multiplicación en medio MS suplementado con ácido giberélico (AG, 0.5mg /L) y (BAP, 1 mg/L). El pH de los medios fue ajustado a 5.9 con NaOH antes de ser autoclavados. El subcultivo de multiplicación de los explantes se realizó cada 4 semanas, en cuarto de cultivo en condiciones estándar de 24°C con un fotoperiodo de 16 horas.

2.2 Medios de cultivo utilizados para la termoterapia y crioterapia

El medio basal (BM) utilizado como base de todos los medios utilizados en estos tratamientos consistió de macronutrientes y micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), con 3g/L de sacarosa y solidificado con 3 g/L de Phytigel. El medio de elongación (EM) de Mathew et al., 2020 se modificó (½ EM) consistiendo en BM

con la mitad de concentración de macronutrientes MS y suplementado con sulfato de cobre, de ácido indol-3-butírico (IBA, 0.05 mg/L), 6-bencilaminopurina (BAP, 0.3 mg/L) y de ácido giberélico (GA3, 0.1 mg/L).

Los medios de precultivo (PCM) consistió en macronutrientes MS a la mitad, micronutrientes MS y vitaminas Linsmaier y Skoog (1965), solidificados con 3 g/L de Phytigel y tres concentraciones de sacarosa (0.25 M, 0.5 M y 0.75 M).

La solución de carga (LS) consistió en BM con macronutrientes MS a la mitad, 2M de glicerol y 0.4 M de sacarosa. La solución de vitrificación de plantas original (PVS2) se modificó según Matthew et al. (2020) y consistió en 30 % (p/v) de glicerol, 15 % (p/v) de etilenglicol y 15 % (p/v) de dimetilsulfóxido en medio MS con 0.4M de sacarosa.

La solución de recuperación (RS) consistió en medio BM con macronutrientes MS a concentración media y 1.2 M de sacarosa. El medio de recuperación (RM) consistió en BM con 0.58 M de sacarosa y solidificado con 3 g/L de Phytigel. El medio de regeneración (RegM) consistió en BM suplementado con 0.1 mg/L de IBA, 1.0 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de GA. Todos los medios fueron llevados a un pH de 5.8 utilizando NaOH antes de ser autoclavados. Las soluciones LS, PVS2 y RS fueron esterilizadas mediante filtración con un filtro de 0.45 µm de nitrocelulosa.

2.3 Termoterapia

Antes de la termoterapia, los explantes fueron colocados en ½ ME durante 4 semanas en condiciones estándar. La termoterapia consistió en diseccionar los explantes a 0.5 cm y luego colocados en nuevo medio ½ EM en placas. Posteriormente, fueron transferidos a una incubadora con 38°C durante 16 horas con luz y 26°C durante 8 horas en la oscuridad durante un periodo de tres semanas (Mathew et al., 2020 modificado)

2.4 Crioterapia

Se siguió el protocolo descrito por Mathew et al. (2020). Después de la termoterapia, los explantes fueron reducidos a 1 mm y transferidos secuencialmente a los medios de pretratamiento. Las puntas de brote se colocaron en medio PCM con sacarosa a una concentración de 0.25 M sobre papel filtro estéril durante 24 horas a 4°C en la oscuridad. Luego se transfirieron al medio PCM al 0.5 M de sacarosa durante 24 horas en las mismas condiciones. Finalmente, las puntas se mantuvieron en medio PCM a 0.75 M de sacarosa durante 72 horas en las mismas condiciones.

Las puntas luego fueron transferidas a la solución de carga (LS) helada y se mantuvieron en ella durante 20 minutos sobre hielo. Luego, se transfirieron a la solución PVS2 helada durante 30 minutos, agitando cada 2 minutos. Posteriormente, las puntas se colocaron en gotas de PVS2 sobre tiras de aluminio estériles (5 × 25 mm) y se sumergieron en nitrógeno líquido (LN) durante 1 hora.

Para la descongelación y recuperación, las puntas se transfirieron inmediatamente a la solución de recuperación (RS) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se transfirieron a placas con medio de recuperación (RM) durante 24 horas en oscuridad.

Posteriormente, las puntas se colocaron en medio de regeneración durante 6 días en oscuridad y luego fueron expuestas a la luz. Los subcultivos se realizaron en medio de regeneración (RegM) cada 2 semanas durante 2 meses.

Después de los tratamientos se registró la supervivencia, determinada por la presencia de callos o crecimiento nuevo, y la regeneración, evaluada por la formación de plántulas completas capaces de ser trasladadas a medio de elongación (EM).

2.5 Diseño experimental

Se establecieron tres grupos experimentales para evaluar el efecto de los tratamientos de termoterapia y crioterapia sobre la supervivencia, regeneración y posible eliminación viral en *Andimora*:

- El grupo control, conformado por 10 explantes elegidos al azar, que se mantuvo en condiciones estándar sin exposición a tratamientos térmicos o criogénicos, para determinar su viabilidad bajo condiciones normales de cultivo *in vitro*.
- El grupo tratado con termoterapia incluyó 30 explantes, los cuales fueron sometidos a un régimen térmico controlado de 38 °C durante el día y 26 °C durante la noche por un periodo de tres semanas.
- El grupo tratado con termoterapia seguida de crioterapia estuvo conformado por 58 explantes. Estos fueron expuestos al mismo régimen de termoterapia inicialmente, seguido por el protocolo de crioterapia modificado.

Cada grupo fue evaluado en función de la supervivencia (presencia de callos o crecimiento nuevo) y regeneración (formación de plántulas y estructuras vegetales completas capaces de ser trasladadas a medio de elongación).

2.6 Diagnóstico mediante RT-PCR

Se realizó una extracción de ARN total partiendo de 70 mg de tejido, siguiendo el protocolo basado en un buffer de extracción de cloruro de litio, seguido de clarificaciones con acetato de potasio (Kac) e isopropanol. (modificado de Halgren et al., 2007). Tras la extracción, se utilizó el protocolo de retrotranscripción Promega M-MLV V 200 U/ul, utilizando los siguientes parámetros: 5 minutos de incubación a 25 °C, 1 hora de extensión a 37°C y 10 minutos de inactivación de la enzima a 85°C.

El cDNA resultante se utilizó en una PCR de punto final utilizando el protocolo de GoTaq Green Master Mix (Promega) con los siguientes parámetros: un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 4 segundos de desnaturalización a 94°C, 40 segundos de hibridación de cebadores a 55-58°C, 1 min de extensión a 72°C y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 1. El producto final de PCR se validó mediante una electroforesis de 40 minutos a 90 voltios en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 1

Descripción de los cebadores utilizados en el ensayo PCR

Virus	Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicón (bp)	Región objetivo
Raspberry bushy dwarf virus	RBDV_427_F	AAAGACKYSCAGAAATCCG	427	CP
		TTA		
	RBDV_427_R	TGWAWARGAAGTTDGGCC		
		ATTT		
Rose ilarvirus - 2	RIV_2_S3_F2	CCATGTGGGAYAATTGTGC	1281	Full-length CP
		CAC		
	RIV_2_S3_R1	GTTTRGCCAACGATGCCTT		
		C		

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Supervivencia y Regeneración

Se evaluó la supervivencia de las plantas de *Rubus glaucus* (variedad Andimora) sometidos a tres condiciones experimentales: grupo control (sin tratamiento), termoterapia, y termoterapia seguida de crioterapia. En este trabajo la supervivencia se define como la presencia de signos iniciales de vida en el explante tratado, como formación de callos o crecimiento visible. A su vez, la regeneración implica el desarrollo completo de una nueva planta o estructuras vegetales a partir del tejido cultivado, evidenciando su potencial para continuar creciendo en condiciones controladas. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Porcentaje de supervivencia y regeneración según el tratamiento aplicado

Tratamiento	Nº plantas	Supervivencia (%)	Regeneración (%)
Control	10	100.00	100.00
Termoterapia	30	6.67	0.00
Termoterapia + Crioterapia	58	6.89	5.17

El grupo control mantuvo una supervivencia del 100 %, confirmando que explantes de la variedad Andimora, a pesar de estar infectados con RBDV y RIV-2, son perfectamente viables bajo condiciones de cultivo *in vitro* estándar (Figura 1). En contraste, la termoterapia de 21 días redujo la supervivencia a 6,67 %, lo que evidencia que el estrés térmico prolongado compromete significativamente la viabilidad de los meristemas. Resultados similares fueron descritos por Wang et al. (2008), donde la supervivencia de los explantes de frambuesa (*Rubus idaeus*)

disminuyó drásticamente al alargar el tiempo de exposición al calor, de 95 % a 32 % cuando el tratamiento pasó de 21 a 42 días. Además, la termoterapia provocó una disminución en la capacidad de regeneración, manifestada en la en la formación de callos en los meristemos (Figura 2), un efecto que se ha observado en numerosos sistemas vegetativos y que se atribuye a daño celular, vacuolización excesiva y reducción de la tolerancia al congelamiento.

Figura 1

Grupo control en cultivo in vitro



Figura 2

Formación de callos después del tratamiento de termoterapia



La combinación termoterapia seguida de crioterapia presentó una supervivencia ligeramente mayor y, lo más relevante, una regeneración del 5,17 %, observándose la formación de hojas nuevas en los meristemos (Figura 3). En este tratamiento la crioterapia elimina las células más diferenciadas, mientras que la termoterapia previa aumenta la proporción de tejido libre de virus en la zona apical. Sin embargo, el calor también puede llevar a la generación células vulnerables, con vacuolas agrandadas y signos de deshidratación, que al ser expuestas a nitrógeno líquido sufren daño por cristalización de agua y ruptura de membranas, reduciendo la capacidad de regeneración (Magyar-Tábori et al., 2021). Por ello, aunque la combinación aumentó ligeramente la supervivencia (6,89 % vs 6,67 %), la tasa de regeneración sigue siendo baja.

Figura 3

Regeneración de los meristemas después del tratamiento combinado de termoterapia y crioterapia



En conjunto, los resultados evidencian que el calor prolongado es aumenta la mortalidad de los explantes, mientras que la termoterapia seguida de crioterapia resulta en un pequeño grupo de meristemas capaces de regenerarse, creando las condiciones necesarias para la eliminación viral sin reducir completamente la viabilidad de los explantes.

3.2 Diagnóstico viral

Para la detección de los virus Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) y Rose Ilarvirus 2 (RIV-2), se realizó un diagnóstico molecular mediante RT-PCR en los grupos experimentales. Con el fin de mejorar la sensibilidad del análisis y permitir la detección viral a partir de cantidades mínimas (inferiores a 1 mg) de tejido vegetal, se optimizó el protocolo de extracción

de ARN, basado en el método de Halgren et al. (2007), adaptado para condiciones a 4 °C. Las modificaciones incluyeron el uso de:

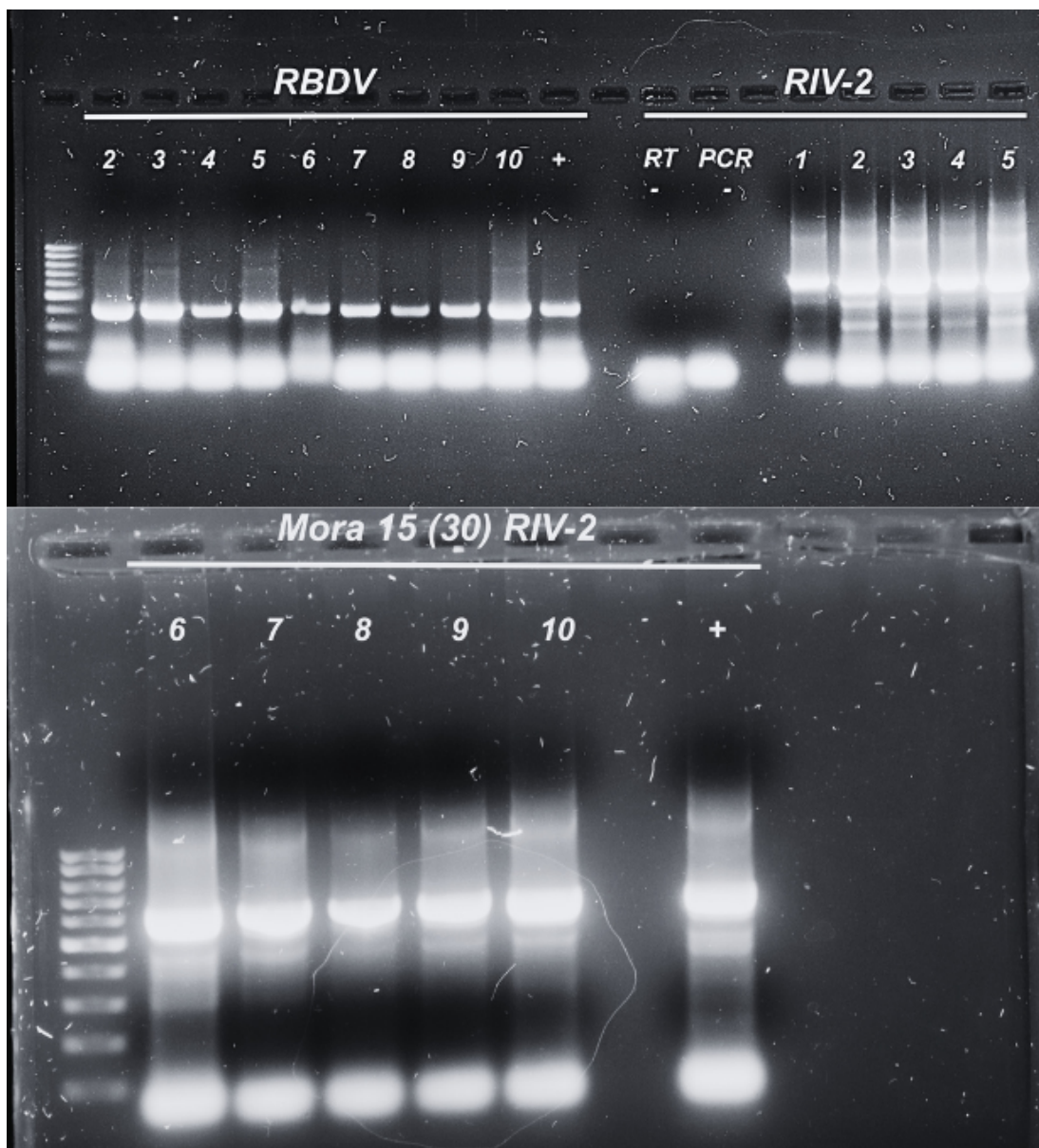
- 350 µL de buffer de extracción con 1% de 2-mercaptoetanol,
- 300 µL de acetato de potasio,
- 500 µL de isopropanol,
- 15 µL de sílica,
- 50 µL de agua ultrapura para la elución final, a partir de lo cual se logró recuperar aproximadamente 40 µL de ARN total por muestra, con una concentración promedio de 19.81 ng/ µL.

Este protocolo fue aplicado tanto al grupo control como a los grupos tratados, permitiendo realizar la extracción sin comprometer la integridad de los explantes.

En el grupo control, compuesto por plantas no sometidas a tratamiento, se confirmó la presencia de RBDV y RIV-2 en el 100% de las muestras analizadas (Figura 4). Este resultado valida que el material vegetal inicial estaba infectado y que, en ausencia de intervención, los virus persisten en los explantes incluso cuando estos son multiplicados bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Figura 4

Resultados de la detección por RT-PCR en el grupo control



Al momento de la preparación de este documento, el diagnóstico viral no pudo ser realizado en muestras correspondientes a los grupos sometidos a los tratamientos (termoterapia y termoterapia + crioterapia), debido a la lenta regeneración del tejido. Las plantas sobrevivientes presentan un tamaño reducido y una biomasa limitada, lo que impide la extracción de tejido sin

comprometer su viabilidad. Por esta razón, se ha decidido posponer esta etapa hasta que los explantes alcancen un desarrollo suficiente que permita realizar un análisis no destructivo.

Esta decisión responde a la necesidad de preservar los pocos explantes regenerados, ya que estos posiblemente podrían representar el inicio de líneas libres de virus, y a su vez, evitar la generación de falsos negativos en la detección por insuficiencia de muestra. Una vez que las plantas tratadas alcancen un tamaño óptimo, se procederá con el diagnóstico molecular para evaluar la eficacia del protocolo propuesto en la eliminación viral en Andimora.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- Los tratamientos afectaron negativamente la regeneración y supervivencia de los meristemos tratados. La termoterapia redujo la supervivencia al 6.67%, evidenciando el daño causado por el estrés en explantes, en comparación al grupo control que mantuvo una supervivencia del 100%. Sin embargo, un índice aún bajo de supervivencia y regeneración de meristemos libres de virus puede tener un gran impacto a la hora de establecer una línea de plantas de mora libres de virus.
- La combinación de termoterapia y crioterapia mostró un pequeño incremento en la supervivencia, y se logró reportar formación de nuevas estructuras vegetales en los meristemos tratados, demostrando que este protocolo puede ser una estrategia útil para obtener plantas sanas y libres de virus tras optimizar las condiciones y parámetros del tratamiento.
- Hasta el momento solo se ha realizado el diagnóstico viral en el grupo control, ya que los meristemos sobrevivientes de los tratamientos aún presentan un tamaño reducido que impide su evaluación. Por lo tanto, la confirmación de la eliminación viral en los grupos tratados dependerá del crecimiento de los explantes regenerados.

4.1.2 Recomendaciones

- Implementar tratamientos de termoterapia con distintas duraciones y ciclos de temperatura para determinar los parámetros más adecuados que permitan incrementar la supervivencia de los explantes sin comprometer su capacidad regenerativa.

- Utilizar pretratamientos como la incorporación de ácido salicílico en el medio de cultivo o la aclimatación previa al frío con el fin de aumentar la tolerancia de los meristemas al estrés térmico y favorecer su regeneración posterior.
- Evaluar los tratamientos propuestos en diferentes variedades de mora andina para identificar aquellas que presentan mayor tolerancia al estrés térmico y criogénico, y adaptar los protocolos según las variedades preferidas por los productores de cada localidad.
- Implementar ajustes en los protocolos de crioterapia, considerando variables como el tipo de solución utilizada (PVS2 vs PVS3) y el tiempo de exposición, con el objetivo de encontrar un equilibrio entre la tasa de regeneración y la eficacia en la eliminación viral.

Referencias

- Allauca, M. (2024). Función de producción de la mora de castilla en la parroquia San Luis, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/13031/1/Allauca%20Amaguaya%20M%20282024%29%20Funci%C3%B3n%20de%20producci%C3%B3n%20de%20la%20mora%20de%20castilla%20en%20la%20parroquia%20San%20Luis%2C%20cant%C3%B3n%20Riobamba%2C%20provincia%20de%20Chimborazo.%28Tesis%20de%20Pregrado%29%20Universidad%20Nacional%20de%20Chimborazo%2C%20Riobamba%2C%20Ecuador.pdf>
- Barrera, V., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez, J., Escudero, L., & Martínez, A. (2017). *Tipificación de los productores de mora de Ecuador para optimizar sus estrategias de medios de vida* *Ecuadorian blackberry producers' typification to optimize their livelihood strategies*.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4660/1/iniapscCD199.pdf>
- Chen, T.-C., Lin, Y.-C., Lin, C.-C., Lin, Y.-X., & Chen, Y.-K. (2022). Rose Virome Analysis and Identification of a Novel Ilarvirus in Taiwan. *Viruses*, 14(11), 2537–2537.
<https://doi.org/10.3390/v14112537>
- Cifuentes, R., Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R. A., Dimitre Mollov, Martínez, A., Ochoa, J., Dan, Tzanetakis, I. E., & Quito-Avila, D. F. (2025). Insights into the virome of the Andean blackberry (*Rubus glaucus*) in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-025-03058-5>

- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., & Martin, R. R. (2007). Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*®, 97(1), 44–50.
<https://doi.org/10.1094/phyto-97-0044>
- Kadriye Çağlayan, Kivilcim Ördek, Gazel, M., Eminur Elçi, Vahid Roumi, Janja Lamovšek, & Irena Mavrič Pleško. (2023). Incidence and genetic diversity of raspberry bushy dwarf virus (RBDV) in *Rubus* spp. in Turkey. *Annals of Applied Biology*, 183(3), 209–219.
<https://doi.org/10.1111/aab.12847>
- Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1), 100–127. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x>
- Magyar-Tábori, K., Mender-Drienyovszki, N., Hanász, A., Zsombik, L., & Dobránszki, J. (2021). Phytotoxicity and Other Adverse Effects on the In Vitro Shoot Cultures Caused by Virus Elimination Treatments: Reasons and Solutions. *Plants*, 10(4), 670–670.
<https://doi.org/10.3390/plants10040670>
- Martínez, A., Vásquez C., W., Viteri D., P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) INIAP ANDIMORA-2013.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4768>
- Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013). Viruses and Virus Diseases of *Rubus*. *Plant Disease*, 97(2), 168–182.
<https://doi.org/10.1094/pdis-04-12-0362-fe>

- Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2015). Control of Virus Diseases of Berry Crops. *Advances in Virus Research*, 271–309. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.003>
- Martínez, A., Viera, W., Jácome, R., Aldaz, L. V., León, A., Mayorga, R. S., & Cecilia, M. (2019). Evaluación de nuevas tecnologías de producción limpia de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), en la zona Andina de Ecuador, para un buen vivir de los fruticultores. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(1), 63–70. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7882132.pdf>
- Mathew, L., Tiffin, H., Erridge, Z., McLachlan, A., Hunter, D., & Pathirana, R. (2020). Efficiency of eradication of Raspberry bushy dwarf virus from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by in vitro chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01829-y>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2013). El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) frutal de clima frío moderado, con propiedades curativas para la salud humana. *Boletín Mensual: Insumos Y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria*, 327.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2024). *Tungurahua, líder en la producción de mora en Ecuador* . Agricultura.gob.ec. <https://www.agricultura.gob.ec/tungurahua-lider-en-la-produccion-de-mora-en-ecuador/>
- Mink, G. I. (1992). Ilarvirus Vectors. *Advances in Disease Vector Research*, 261–281. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2910-0_8
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Quito-Avila, D. F., Ibarra, M. A., Alvarez, R., Peralta, E. L., & Martin, R. R. (2014). A raspberry bushy dwarf virus isolate from Ecuadorean *Rubus glaucus* contains an additional RNA that is a rearrangement of RNA-2. *Archives of Virology*, 159(9), 2519–2521. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2069-4>
- Quito-Avila, D. F., Lightle, D., & Martin, R. R. (2014). Effect of Raspberry bushy dwarf virus, Raspberry leaf mottle virus, and Raspberry latent virus on Plant Growth and Fruit Crumbliness in “Meeker” Red Raspberry. *Plant Disease*, 98(2), 176–183. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-13-0562-re>
- Untiveros, M., Perez-Egusquiza, Z., & Clover, G. (2010). PCR assays for the detection of members of the genus Ilarvirus and family Bromoviridae. *Journal of Virological Methods*, 165(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.011>
- Wang, M.-R., Cui, Z.-H., Li, J.-W., Hao, X.-Y., Zhao, L., & Wang, Q.-C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, q., Cuellar, w. J., Rajamäki, m.-l., Hirata, y., & Valkonen, j. P. T. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
- Wang, Q.-C., Chen, L., Zhang, Z., Dag-Ragnar Blystad, & Wang, Q.-C. (2018). *Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species*. 257–268. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_17
- Zhao, L., Wang, M.-R., Cui, Z.-H., Chen, L., Volk, G. M., & Wang, Q.-C. (2018). Combining Thermotherapy with Cryotherapy for Efficient Eradication of Apple stem grooving virus

from Infected In-vitro-cultured Apple Shoots. *Plant Disease*, 102(8), 1574–1580.

<https://doi.org/10.1094/pdis-11-17-1753-re>