



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *Chrysanthemum morifolium* L. var. "Harman" LIBRES DE *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

ÁNGEL MARTÍNEZ INFANTE

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



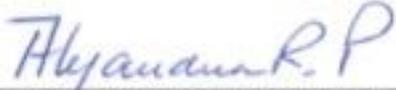
COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

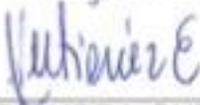
La presente tesis titulada: **Micropropagación de plantas de *Chrysanthemum morifolium* L. var. "Harman", libres de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)**, realizada por el estudiante: **ÁNGEL MARTÍNEZ INFANTE**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A) 
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR (A) 
DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR (A) 
DRA. MARÍA ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, julio de 2022

**MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *Chrysanthemum morifolium* L.
var. "Harman" LIBRES DE *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)**

**Ángel Martínez Infante, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022**

RESUMEN

El crisantemo es uno de los cultivos ornamentales más demandados y productivos en México y el mundo; sin embargo, se ve afectado por diversas enfermedades virales que reducen su producción y la calidad de sus flores. Los métodos de propagación vegetativa utilizados en la producción de crisantemo, permiten la diseminación y establecimiento de virus, por lo que resulta necesario buscar alternativas viables para obtener propágulos sanos. Establecer un protocolo que permita obtener y propagar plantas de *Chrysanthemum morifolium* L. var. Harman, libres del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).. Segmentos nodales de plantas de crisantemo infectadas por TSWV, verificadas por RT-PCR, fueron cultivados en el medio de Murashige y Skoog (MS) al 50 % suplementado con antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico), antibióticos (cefotaxima, ampicilina) y reguladores de crecimiento (ácido giberélico, ácido indol-3-acético). Después de 30 días de cultivo se encontró que 100 % de los brotes regenerados en un medio que contenía únicamente antibióticos o una combinación de estos con antioxidantes y reguladores, estaban libres del TSWV. Para la multiplicación de los brotes sanos se probó un sistema de inmersión temporal (BIT) con y sin soporte de poliuretano y uno con sistema semisólido. Después de 30 días de cultivo, la respuesta de los explantes cultivados en el sistema BIT sin soporte de poliuretano fue inferior a la observada en aquellos que permanecieron en el sistema con medio semisólido. El soporte de poliuretano en el sistema BIT mejoró la velocidad de crecimiento de los brotes regenerados, así como el aumento del diámetro del tallo, del número de hojas y de la supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación. El soporte de poliuretano disminuyó significativamente la hiperhidratación de los brotes generados y promovió su enraizamiento. Este protocolo desarrollado es una alternativa viable y económica para la producción masiva de plantas de crisantemo var. Harman libres del TSWV.

Palabras clave: *C. morifolium*, plantas libres de virus, TSWV, multiplicación, antibióticos, antioxidantes, reguladores, sistemas de inmersión temporal.

MICROPROPAGATION OF *Chrysanthemum morifolium* L. var. “Harman” PLANTS FREE FROM THE VIRUS *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV)

Ángel Martínez Infante, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Chrysanthemum is one of the most demanded and productive crops in Mexico and the world; however, it is affected by several viral diseases that reduce its production and the quality of its flowers. The vegetative propagation methods used in chrysanthemum production allow the dissemination and establishment of viruses, so it is necessary to look for viable alternatives to obtain healthy plants. Establish a protocol to obtain and propagate plants of *Chrysanthemum morifolium* L. var. Harman, free of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Nodal segments of TSWV-infected chrysanthemum plants, verified by RT-PCR, were grown on a 50% Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with antioxidants (ascorbic acid, citric acid), antibiotics (cefotaxime, ampicillin) and growth regulators (gibberellic acid, indole-3-acetic acid). After 30 days of culture, 100 % of the shoots regenerated on a medium containing only antibiotics or a combination of antibiotics with antioxidants and regulators were found to be free of TSWV. For multiplication of healthy shoots, a temporary immersion system (BIT) with and without polyurethane support and a semi-solid system were tested. The response of explants grown in the BIT system without polyurethane support was lower than that observed in those that remained in the system with the semi-solid medium. Polyurethane support in the BIT system positively affected the growth rate of regenerated shoots, as well as stem diameter, number of leaves, and plant survival in the acclimatization stage. The polyurethane support significantly decreased the hyperhydration of the shoots generated and promoted their rooting. The developed protocol is a viable alternative for mass production of TSWV-free chrysanthemum var. Harman plants.

Keywords: *C. morifolium*, virus-free plants, TSWV, multiplication, antibiotics, antioxidants, regulators, temporary immersion system.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al colegio de postgraduados y al Programa de Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal Campus Montecillo.

A mis padres Rolando y Patricia, por ese amor único que han sabido demostrar. Todo su esfuerzo, trabajo y corazón generoso continúan vivos y que pese a los años, no he dejado de ser hijo y alumno agradecido.

A mis hermanos Eduardo y Rolando, quienes han sido ejemplo de trabajo y esfuerzo.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, por ser parte fundamental del proyecto, por su paciencia y empeño en seguir transmitiendo su conocimiento.

Al comité evaluador; Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa, Dr. Daniel L. Ochoa Martínez y al Dr. Víctor González Hernández.

A mi familia académica, a mis nobles amigos; Mario, Lupita, Sigrid, Jorge, Sony y Majo, que han compartido su invaluable tiempo y se han convertido en huéspedes eternos, de esta breve travesía.

A mi amigo de la infancia Bernabe, quien se ha levantado ante la adversidad de la vida.

Al señor productor Ángel Reyes Romero, por proporcionar las plantas de crisantemo.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE CUADROS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
Hipótesis General	4
Hipótesis Específicas	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Importancia del cultivo de crisantemo	5
Descripción botánica	6
Métodos de propagación de crisantemo	6
Enfermedades presentes en el cultivo de crisantemo	7
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	8
Características genéticas del TSWV	8
Mecanismo del silenciamiento génico en plantas	9
Metilación del DNA vegetal y viral	10
Cultivo de meristemos	12
Termoterapia <i>in vitro</i>	12

Quimioterapia <i>in vitro</i>	13
Componentes alternativos para la erradicación de virus en plantas	14
Reguladores del crecimiento	14
Antioxidantes	15
Antibióticos	16
Multiplicación de plantas libres de virus	17
Sistemas en medios semisólidos	17
Sistemas de inmersión temporal	18
Métodos de detección de virus	22
Pruebas inmunológicas	22
Pruebas moleculares	23
RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)	23
PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CRISANTEMO LIBRES DE VIRUS POR CULTIVO DE TEJIDOS: UNA REVISIÓN	25
Principales virus que afectan al cultivo de crisantemo	26
Técnicas para la erradicación de virus en crisantemo	27
Cultivo de meristemos	27
Termoterapia <i>in vitro</i>	30
Quimioterapia	32
Propagación masiva de plantas de crisantemo libres de virus	33
Multiplicación en biorreactores	37
Conclusiones	38

CAPÍTULO I. NUEVO PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS

DE CRISANTEMO LIBRES DEL <i>Tomato Spotted Wilt Virus</i> (TSWV).....	39
1.1. RESUMEN.....	39
1.2. ABSTRACT	40
1.3. INTRODUCCIÓN	41
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS	42
1.2.1 Detección del virus por RT-PCR.....	43
1.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV	44
1.2.2.1 Desinfestación del material vegetal	44
1.2.2.2 Experimento 1. <i>Efecto combinado de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV</i>	44
1.2.2.3 Experimento 2. <i>Efecto independiente de antioxidantes, reguladores de crecimiento y antibióticos en la regeneración de plantas libres del TSWV</i>	45
1.2.3 Diseño experimental.....	46
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
2.3.1 <i>Detección de TSWV en plantas de crisantemo var. Harman</i>	47
2.3.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres de TSWV	47

2.3.2.1 <i>Experimento 1. Efecto combinado de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV</i>	47
2.3.2.2 <i>Experimento 2. Efecto independiente de antioxidantes, reguladores de crecimiento y antibióticos en la regeneración de plantas libres del TSWV</i>	50
1.6. CONCLUSIONES	54
CAPITULO II. COMPARACIÓN DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT) Y UN SISTEMA CON MEDIO SEMISÓLIDO EN LA MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS DE <i>Chrysanthemum morifolium</i> L. LIBRES DE VIRUS	
2.1. RESUMEN	56
2.2. ABSTRACT	57
2.3. INTRODUCCIÓN	58
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.2.1 Material vegetal	60
2.2.2 <i>Multipliación en un sistema con medio semisólido y uno de inmersión temporal</i>	61
2.2.2.1 Sistema en medio semisólido.....	61
2.2.2.2 Sistema de inmersión temporal.....	62
2.2.2.3 <i>Soporte de poliuretano en los sistemas de inmersión temporal</i>	62
2.2.3 <i>Aclimatación de plantas provenientes de los medios semisólidos y el BIT</i>	63
2.2.4 Análisis estadístico	63

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
<i>2.3.1 Multiplicación en un sistema con medio semisólido y uno de inmersión temporal (BIT)</i>	63
<i>2.3.2 Efecto del sistema de cultivo en la hiperhidratación y aclimatación....</i>	66
<i>2.3.3 Efecto del Soporte de poliuretano en los sistemas de inmersión temporal (BIT)</i>	68
2.6. CONCLUSIONES	72
CONCLUSIONES GENERALES	73
LITERATURA CITADA.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama esquemático de un sistema de inmersión temporal, vasos gemelos (BIT); **A) fase de secado (gaseosa)**; a) Explantes libres de virus; b) Frasco con brotes regenerados a partir de plantas libres de virus; c) frasco con medio líquido; d) filtros de membrana ; e) mangueras de silicona para el intercambio de medio de cultivo; g) mangueras para el flujo de aire; conectadas a la bomba h) soporte de poliuretano; **B) fase en inmersión. (Elaboración propia)**. 20
- Figura 2.** Detección del TSWV por RT-PCR (amplicón 501 pb) en *Chrysanthemum morifolium*. Plantas madre infectadas, carriles P4, P5 y P6. MP: marcador de peso molecular (1000-100 pb); N: testigo negativo; P: testigo positivo..... 47
- Figura 3.** Primer experimento. A) Plantas regeneradas en el medio MS-AAR (reguladores, antibióticos y antioxidantes), carriles 1 al 9; plantas regeneradas en el medio MS-AOX1 (reguladores y antioxidantes), carriles 10 al 16. B) Plantas regeneradas en el medio MS-AOX1, carriles 1 y 2; plantas regeneradas en el medio MS-AOX (antioxidantes), carriles del 3 al 11. P: Testigo positivo (501 pb); N: testigo negativo; MP: marcador de peso molecular (100-1000 pb)..... 49
- Figura 4.** Plantas regeneradas a partir de explantes nodales de *C. morifolium*. A) Brotes formados en el medio MS-REG (AG₃ y AIA), después de 14 días de cultivo. B) Brote generado en un medio MS-EST (antioxidantes, reguladores, antibióticos). C) Brote en un medio MS-ANT (antibióticos). 51

- Figura 5.** Experimento 2. A) Plantas regeneradas en el medio MS-AAR (reguladores, antibióticos, antioxidantes), carriles 1 al 10. B) Plantas obtenidas en el medio MS-REG (reguladores) carriles 1 al 10. C) Plantas generadas en el medio MS-ANT (antibióticos), carriles 1 al 10. MP: marcador de peso molecular; N: testigo negativo; P: testigo positivo. 52
- Figura 6.** Plantas de crisantemo después 30 días de cultivo. **A)** Planta regenerada en un sistema con medio semisólido; **B)** Planta regenerada en BIT; **C)** Planta hiperhidratada obtenida en BIT. 64
- Figura 7.** Efecto del sistema de cultivo en la hiperhidratación de los brotes (**A**) y la aclimatación (**B**) de las plantas de *C. morifolium* var. Harman. **SEM:** medio semisólido; **BIT:** sistema de inmersión temporal. Las barras representan la media + la desviación estándar. Letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05) 66
- Figura 8.** Efecto del soporte de poliuretano en la hiperhidratación (A), enraizamiento (B) y aclimatación (C) de los brotes *C. morifolium* L. Harman. **SOPORTE:** sistema BIT con soporte de poliuretano; **SIN:** sistema BIT sin soporte de poliuretano; Las barras representan la media + la desviación estándar. Letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). 69
- Figura 9.** Plantas de *C. morifolium* L. var. Harman regeneradas en un sistema BIT. **A)** Regeneradas en un sistema BIT sin soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **B)** Plantas con raíz, a partir de un sistema BIT con soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **C)** Brotes generados en

un BIT con soporte; **D)** Plantas en un sistema BIT con soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **E)** plantas regeneradas en un BIT con soporte (después de 7 en aclimatación)..... 69

Figura 10. Plantas aclimatadas a los 45 días en aclimatación..... 71

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en el primero y segundo experimentos, para probar el efecto de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes, en la regeneración de plantas de crisantemo var. Harman, libres del TSWV.	45
Cuadro 2. Efecto de la combinación de antioxidantes, antibióticos y reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas de <i>Chrysanthemum moriflorun</i> libres de virus.	48
Cuadro 3. Prueba Chi-cuadrada y coeficientes de asociación. Experimento 1.	49
Cuadro 4. Efecto independiente de antioxidantes, antibióticos y reguladores en la regeneración de plantas de crisantemo var. Harman libres de virus (Experimento 2).	51
Cuadro 5. Prueba Chi-cuadrada y coeficientes de asociación. Experimento 2.	52
Cuadro 6. Efecto del sistema de cultivo en la multiplicación de brotes de <i>C. morifolium</i> var. Harman, después de 30 días de cultivo.	64
Cuadro 7. Efecto del soporte de poliuretano en el sistema BIT sobre la regeneración de brotes <i>C. morifolium</i> L. variedad Harman.	70

INTRODUCCIÓN GENERAL

La floricultura es uno de los rubros más importantes para la economía del mundo (SAGARPA, 2015). El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) se encuentra entre los tres cultivos ornamentales más demandados a nivel mundial y nacional, debido a su enorme valor económico y cultural (Boase *et al.*, 1997; Esquivel *et al.*, 2005). Las variedades comerciales de crisantemo se propagan vegetativamente por esquejes, estacas o por cultivo de tejidos. La calidad de las flores depende del manejo agronómico de la planta, y del control de plagas y enfermedades (Gaytan-Acuña *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2020). De las enfermedades que más afectan al cultivo de crisantemo son las causadas por virus; dentro de los virus más importantes se encuentra el *Tomato aspermy virus* (TAV), el *Cucumber mosaic virus*, *Chrysanthemum virus B* y el *Tomato spotted wilt virus* (Verma *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2011; Ram *et al.*, 2005). Durante los ciclos de propagación vegetativa, los agentes infecciosos pueden transmitirse de generación en generación, reduciendo la calidad y el valor comercial de las flores cosechadas (del Valle *et al.*, 2005).

El cultivo de tejidos, mediante el cultivo de meristemos ha sido una herramienta valiosa en la producción de plantas libres de virus en *Solanum tuberosum* L., *Fragaria chiloensis* L., y *C. morifolium* L. (Waswa *et al.*, 2017; Quiroz *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2009; Ram *et al.*, 2009;).

Aún cuando en crisantemo (variedades: Stroika, Dewi sartika, White fiji, Pooja y Regol time) se ha reportado la obtención de plantas libres de virus (Budiarto, 2011; Kumar *et al.*, 2009; Ram *et al.*, 2009), la implementación de esta técnica puede generar resultados

diferentes entre variedades vegetales (Ram *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, y a que la disección de los meristemas es una actividad laboriosa que consume tiempo y mano de obra, una forma alternativa de generar plantas libres de virus consiste cultivar órganos distintos a los meristemas en presencia de compuestos como antioxidantes, antibióticos o reguladores de crecimiento. (Li *et al.*, 2019; Schmitt *et al.*, 1997). Existen reportes que indican que el ácido ascórbico y el ácido cítrico son antioxidantes que tienen la capacidad de inhibir la replicación viral (Fujiwara *et al.*, 2013) e inducir genes de resistencia contra los virus (Basit *et al.*, 2021). Asimismo, se tiene evidencia de que algunos antibióticos pueden causar hipermetilación e hipometilación del ADN en las plantas, (Schmitt *et al.*, 1997; Bardini *et al.*, 2003) lo cual podría desencadenar procesos de señalización que contrarresten el ciclo de infección del virus (Boyko *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2007).

No obstante, en el cultivo de crisantemo no existen reportes sobre la generación de plantas libres de virus a partir del uso de antibióticos, antioxidantes o reguladores de crecimiento.

Por otro lado, la propagación masiva *in vitro* de plantas libres de virus, convencionalmente se lleva a cabo utilizando medios semisólidos; sin embargo, el tiempo y los costos de producción en estos sistemas, suelen ser elevados debido a que se requiere un agente gelificante, además de que el crecimiento y la multiplicación se ven limitados por el espacio reducido de los recipientes utilizados (Monja-Mio *et al.*, 2021; Gatti *et al.*, 2017). Una alternativa a esta forma de propagación, es el uso de los sistemas de inmersión temporal automatizados (SIT), los cuales consisten en la inmersión del explante en el medio de cultivo por cortos periodos de tiempo (Mosqueda-Frómata *et al.*, 2017; Vives *et al.*, 2017). Los SIT pueden incrementar las tasas de multiplicación, reducir

los costos y el tiempo de producción, reducir las anomalías e hiperhidricidad de los brotes regenerados (Kim *et al.*, 2020; Hahn y Paek. 2005; Albarran *et al.*, 2005). La propagación masiva de plantas de interés económico como manzano (*Malus domestica*), anturio (*Anthurium andreanum* Lind.) ha sido posible mediante el uso de los SIT (Kim *et al.*, 2020; Martínez-Estrada *et al.*, 2019). En crisantemo (var Golden bel), el uso de un sistema de inmersión temporal (SETIS), incrementó la calidad de los brotes regenerados, en comparación con el cultivo líquido y semisólido (Hwang *et al.*, 2022). Sin embargo, la respuesta en la regeneración, ha dependido del genotipo, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de la planta (Teixeira *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2011; Valle-Sandoval *et al.*, 2008).

Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron:

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Establecer un protocolo que permita obtener y propagar plantas de *Chrysanthemum morifolium* L. var. Harman, libres del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico), antibióticos (cefotaxima, ampicilina) y reguladores de crecimiento (ácido giberélico, ácido indolacético), en la generación de plantas de crisantemo libres del TSWV, a partir del cultivo de segmentos nodales.

Comparar la eficiencia de un sistema de inmersión temporal (BIT) y un sistema en medio semisólido, en la multiplicación de plantas de crisantemo libres de TSWV.

Hipótesis General

El protocolo desarrollado permitirá obtener y propagar eficientemente, plantas de *C. morifolium* var. Harman, libres del *Tomato spotted wilt virus*.

Hipótesis Específicas

La adición de antibióticos al medio de cultivo, de manera independiente o combinada con reguladores de crecimiento y antioxidantes, permitirá obtener plantas de crisantemo libres de *Tomato spotted wilt virus*, a partir de segmentos nodales.

El sistema de inmersión temporal (BIT) generará plantas de mejor calidad que el sistema con medio semisólido.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del cultivo de crisantemo

En México, el mercado de flores ornamentales representa una actividad económica muy importante. De acuerdo con datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el año 2013 su producción alcanzó un valor de más 481 millones de dólares, de los cuales participaron 25 500 productores de flores de corte, plantas de maceta, follaje de corte y follaje de maceta, generando además 188 mil empleos permanentes, 50 mil empleos eventuales, y más de un millón de forma indirecta (SAGARPA 2015).

El crisantemo es una planta ornamental que es utilizada como flor de corte y planta de maceta. Derivado de su amplia gama de colores, formas, estructuras y tamaños (Noda *et al.*, 2017), posee un gran valor cultural y económico en todo el mundo, ocupando el segundo lugar de la lista de los cultivos florícolas de mayor importancia económica, solo después de la rosa (Teixeira y Kulus, 2014a).

En México en los últimos años, el crisantemo se ha posicionado como la flor de corte de mayor valor de producción, superando a la rosa (SIAP 2020). Esta flor se cultiva principalmente en el Estado de México, siendo el principal productor (SIAP 2020). A pesar de presentar una tendencia ascendente en su valor (Osuna *et al.*, 2016), el cultivo del crisantemo se enfrenta a problemas causados principalmente por plagas y enfermedades (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2015).

Descripción botánica

Pertenece a la familia de las *Astereaceas*, esta flor es originaria de Asia Oriental y se cultivó por primera vez en China en el siglo XV A.C. siendo introducida posteriormente a Japón, Europa y EU (Anderson, 2007).

De acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICN), el crisantemo es clasificado como *Chrysanthemum x morifolium* Ramat desde 1999 (Spaargaren y van Geest 2018). Su flor está compuesta por una inflorescencia en forma de capítulo, que tiene en el centro, flores hermafroditas que van del color amarillo a blanco y verde, mientras que las flores liguladas que se encuentran en el borde, van desde púrpura, verdes, amarillo, rosa, naranja, rojo y blanco, de acuerdo a la variedad; además son flores masculinas estériles.

Métodos de propagación de crisantemo

El crisantemo comúnmente se propaga de forma vegetativa a partir de esquejes en crecimiento vegetativo. Esta práctica es elegida por su simplicidad y conservación de los rasgos genéticos de la planta madre (Zhang *et al.*, 2013). De acuerdo con Gaytán-Acuña *et al.* (2006), los tallos utilizados como semillas, deben cumplir con características de calidad que aseguren su buen desarrollo y producción en invernadero. No obstante, esta práctica tiende a reducir el vigor y calidad de los esquejes obtenidos de la planta donadora, además de presentar limitaciones en la generación de raíces (Wise *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2020).

Aunado a esto, la transmisión de microorganismos fitopatógenos por esquejes o injertos es un problema común en este método de propagación (Barbosa *et al.*, 2005; Bausher 2013).

Enfermedades presentes en el cultivo de crisantemo

El cultivo de crisantemo se ve afectado por un gran número de enfermedades, causadas por hongos, bacterias, fitoplasmas, viroides y virus, que reducen la calidad de las flores y su valor comercial (Solano-Baez *et al.*, 2013; Végh *et al.*, 2014; Min *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; Matsuura *et al.*, 2007). Las enfermedades virales representan un problema importante en este cultivo al disminuir la calidad de las flores; se han reportado más de 20 virus asociados a esta planta siendo el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) uno de los más importantes (Vásquez *et al.*, 1999; Trolinger *et al.*, 2017; Sivaprasad *et al.*, 2018)

La distribución del virus en la planta generalmente es heterogénea, los meristemos que se encuentran alejados del tejido vascular más diferenciado, presentan menor número de partículas virales (Faccioli, 2001).

La infección viral inicia cuando el virus penetra por una herida en la pared de las células de la planta (Sepúlveda *et al.*, 2011), la cual puede ser provocada por vectores como artrópodos, nematodos, hongos o plasmodioforales. Las prácticas de cultivo, la multiplicación vegetativa o por injerto así como la transmisión mecánica y por semilla aseguran también la continuidad del virus en sus progenies (Albouy *et al.*, 2000; Matsuura *et al.*, 2004).

Tomato spotted wilt virus (TSWV)

El TSWV se encuentra entre los virus fitopatógenos más importantes en la agricultura, debido al daño que ocasiona en los cultivos, a la complejidad de la interacción virus-vector-planta, a sus características genéticas y biológicas, así como su amplia distribución (Scholthof *et al.*, 2011; Rybicki, 2015).

El TSWV está presente en países como India, Corea del Sur, Egipto, Serbia, Bosnia, Ecuador, Venezuela y México (Senthilraja *et al.*, 2021; Yoon *et al.*, 2020; El-Attar *et al.*, 2017; Stanković *et al.*, 2013; Kohnić *et al.*, 2019; Sivaprasad *et al.*, 2018; Marys *et al.*, 2014).

El TSWV pertenece al género *Orthospovirus*, familia *Bunyaviridae*, es un virus con envoltura que posee partículas isométricas de 70-90 nm de diámetro, envueltas por una membrana fosfolipídica. Los síntomas principales que se asocian a este virus en plantas de crisantemo son: necrosis de las venas, manchas necróticas, pardeamiento de los pétalos, flores malformadas y tallos necróticos (Senthilraja *et al.*, 2021). En casos severos, también se ha observado necrosis extensa, marchitez y muerte de las plantas, estimando una incidencia del 30 % (Renukadevi *et al.*, 2015).

Características genéticas del TSWV

El genoma del TSWV está compuesto por tres segmentos de RNA de sentido negativo y positivo (ambisentido), los cuales se encuentran envueltos por ribonucleoproteínas (RNP's) (Whitfield *et al.*, 2005). Los genomas del TSWV se clasifican de acuerdo a su tamaño en grande (L), mediano (M) y pequeño (S) (Hu *et al.*, 2011; Law y Moyer, 1990). El segmento L codifica la proteína RdRp asociada a la replicación y transcripción del

genoma del virus (Chapman *et al.*, 2003; De Haan *et al.*, 1991). El segmento M es ambisentido, esto significa que la cadena positiva codifica para una proteína no estructural NSm de 33.6 kDa, y la cadena negativa codifica proteínas precursoras de las glicoproteínas G1 y G2 (Kormelink *et al.*, 1992; Lewandowski y Adkins, 2005). NSm está asociada al movimiento del virus en la célula hospedante, debido a las modificaciones estructurales que realiza en los plasmodesmos, permitiendo el paso de las partículas virales de una célula a otra (Kormelink *et al.*, 1994, Storms *et al.*, 1995; van Lent y Schimtt-Keichinger, 2006).

El segmento S codifica en la cadena positiva a la proteína NSs de 52.2 kDa y en la cadena negativa a la proteína N de 28.8 kDa (Aramburu *et al.*, 2007; Heinze *et al.*, 2001). NSs es una proteína asociada a la inducción de síntomas, rompimiento de la resistencia y supresión del silenciamiento del RNA viral (Margarita *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2002).

Mecanismo del silenciamiento génico en plantas

El silenciamiento génico de RNA es un proceso natural que ocurre en el desarrollo de las plantas para regular su expresión génica, y se ha descrito como un mecanismo de defensa contra infecciones virales y otros patógenos (García y Pallas, 2015). Este mecanismo es guiado por pequeños segmentos de RNA interferentes (RNAi) que dirigen el corte, degradación y/o represión de la traducción de RNA mensajeros (RNAm) o el bloqueo de la transcripción (Cuperus *et al.*, 2010).

El proceso de silenciamiento génico viral inicia con el reconocimiento del RNA bicatenario del virus (RNAbc) por parte de un grupo de ribonucleasas de la planta, conocidas como DICER (DCL). Estas enzimas reconocen el RNAbc y lo cortan en fragmentos de 21 a 24

nucleótidos denominados RNA interferentes (RNAi) (Deleris *et al.*, 2006; Lacomme, 2015). Los RNAi generados son reconocidos por un grupo de proteínas denominadas argonautas (AGO) que tienen la función de incorporar los RNAi al complejo ribonucleoproteico llamado RISC (Lacomme, 2015). Durante esta etapa la cadena antisentido del RNAi se une a RISC y guía al complejo para degradar el RNA monocatenario viral (Brosseau y Moffett, 2015).

Sin embargo, los virus poseen proteínas que le permiten evadir los mecanismos de silenciamiento génico a las cuales se les denomina proteínas supresoras del silenciamiento génico (García y Pallas, 2015).

El TSWV codifica la proteína NSs que tiene diversas funciones, destacando la supresión del silenciamiento del RNA viral (Takeda *et al.*, 2002). NSs tiene además la capacidad de secuestrar RNAi (Eifan *et al.*, 2013), unirse a las cadenas largas del RNAbc (García *et al.*, 2006) y al segmento S impidiendo su reconocimiento y degradación por el complejo RISC (Bag *et al.*, 2012).

Metilación del DNA vegetal y viral

La metilación del DNA es un proceso biológico en el que la enzima metiltransferasa tiene la capacidad de añadir un grupo metilo a la cadena de DNA (Colot y Rossignol, 1999). Este proceso es dirigido por RNAs no codificantes (RdDM) que activan la señal de metilación (Zhang *et al.*, 2018). La metilación puede ocurrir en todos los casos donde se encuentra citosina: CG, CHG, y CHH.

Las metilaciones del DNA son conocidas como modificaciones epigenéticas, y hasta no hace mucho, se desconocía la existencia de este tipo de modificaciones en los genomas

virales y vegetales, durante el ciclo de infección (Baulcombe y Dean, 2014; Sharma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012).

Las infecciones causadas por virus con genoma DNA, generalmente se suprimen a través de modificaciones transcripcionales guiadas por RdDM que interrumpen su transcripción (Coursey *et al.*, 2018).

En los virus con genoma RNA se han encontrado metilaciones N⁶-metiladenosina (m⁶A), una modificación reversible que ocurre en la posición N6 del genoma (Esteve-Puig *et al.*, 2020; He *et al.*, 2019). En genomas del *Alfalfa mosaic virus* se ha reportado que las adenosinas tienen modificaciones en esta posición, afectando negativamente la infección del virus en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Martínez-Perez *et al.*, 2017).

Métodos para la producción de plantas certificadas libres de virus

La generación de plantas libres de virus se ha convertido en una actividad que permite controlar y proteger los sistemas agrícolas de las infecciones virales en plantas ornamentales (Panattoni *et al.*, 2013; Krczal *et al.*, 1998).

El cultivo de tejidos a través del cultivo de meristemos ha permitido la clonación de plantas genéticamente estables y libres de virus en *C. morifolium* var. Resome Splendid y Pooja (Kazeroonian *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2009).

El cultivo de meristemos, la termotarapia, la quimioterapia o la combinación de éstas ha sido una alternativa eficaz en la erradicación de virus en plantas (Smith *et al.*, 2017).

Cultivo de meristemas

Los principales métodos para la erradicación de virus están basados en el cultivo *in vitro* de meristemas. Los meristemas no poseen elementos vasculares desarrollados, dificultando el transporte de las partículas virales hasta esa zona (Bhojwani y Dantu, 2013). Además, las células meristemáticas tienen una tasa de replicación mayor que la del virus, lo que ocasiona una “dilución” de éste en la planta (Luppichini, 2000). Se ha encontrado que mientras más pequeño es el tamaño del meristemo, mayor es la posibilidad de eliminación del patógeno (Mori y Hosokawa 1977).

Para producir plantas libres de virus mediante el cultivo de meristemas deben considerarse factores como: el tamaño del meristemo, su posición en la planta, infecciones endógenas, período de recuperación, composición del medio de cultivo y crecimiento de las plantas producidas (Cha-um *et al.*, 2006).

Termoterapia *in vitro*

El tratamiento térmico de plantas *in vivo* o *in vitro* reduce el número de virus y mejora la eficacia para su erradicación (Hu *et al.*, 2015a; Hu *et al.*, 2015b). La termoterapia se ha complementado con el cultivo de meristemas (Hu *et al.*, 2012; Lassois *et al.*, 2013; Manganaris *et al.*, 2003; Zilka *et al.*, 2002) mejorando notablemente la generación de brotes libres de virus en plantas de pera (*Pyrus communis*) (Hu *et al.*, 2019), lirio (*L. x elegans* Thunb) (Nesi *et al.*, 2009) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Ali *et al.*, 2013). Incluso si no se eliminan éstos, las altas temperaturas pueden ralentizar su tasa de replicación e infección, permitiendo que crezcan nuevos brotes (Wang *et al.*, 2008).

La termoterapia se basa fundamentalmente en la aplicación de temperaturas altas durante períodos de tiempo largos con el objeto de reducir o inhibir la síntesis del RNA viral (Wang *et al.*, 2008). De acuerdo con Budiarto (2011) las partículas virales de *Cucumber mosaic virus* se afectaron cuando se sometieron a temperaturas de 38-40 °C durante tres semanas, lo que favoreció la generación de plantas sanas. Además sugiere que el éxito de la técnica depende del nivel de tolerancia de la planta a las temperaturas altas, así como de su estado fisiológico (Ali *et al.*, 2013). Determinar las condiciones óptimas para la generación de plantas sanas es crucial para el éxito de cualquier protocolo de propagación (Waswa *et al.*, 2017).

Quimioterapia *in vitro*

La quimioterapia combinada con el cultivo de tejidos ha sido una estrategia utilizada para la producción de plantas libres de virus (Khurana 2004). Los tratamientos con agentes antivirales se pueden dirigir a la planta madre o agregar al medio de cultivo (Klein y Livingston, 1983). Los antivirales se han descrito como antimetabolitos que tienen la capacidad de inhibir la síntesis del genoma viral (Hansen y Lane 1985). Sin embargo, los antivirales pueden llegar a ser tóxicos en altas concentraciones, limitar el crecimiento de las plantas regeneradas, o ser ineficaz cuando se usa en dosis bajas, además de generar resistencia (Hansen y Lane 1985; Cieślińska 2007; Yang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2003). Es necesario complementar las técnicas de quimioterapia con la termoterapia y el cultivo de meristemas para aumentar el número de plantas regeneradas libres de virus.

En crisantemo, compuestos como el 2-thiuracilo, clorhidrato de amantadina, aciclovir y ribavirina se han utilizado como agentes antivirales, pero solo la ribavirina ha demostrado efectividad en la erradicación de virus como el *Tomato aspermy virus* (Ram *et al.*, 2005; Ram *et al.*, 2009).

Componentes alternativos para la erradicación de virus en plantas

Las técnicas basadas en el cultivo de meristemos, la termoterapia y quimioterapia *in vitro* han resultado ser laboriosas, complejas y dan lugar a bajos porcentajes de plantas sanas (Ram *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, se ha optado por evaluar *in vitro* el efecto de otros compuestos en la reducción del daño causado por virus y otros patógenos (Li *et al.*, 2019).

Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento vegetal, son utilizados para inducir el crecimiento y diferenciación celular, buscando obtener cierto tipo de respuesta morfogénica (organogénesis y embriogénesis). Se aplican al medio de cultivo en concentraciones muy bajas (0.0001-0.1M).

Las auxinas se usan en el cultivo *in vitro* para promover la división celular, la citodiferenciación e inducir la organogénesis y embriogénesis. Otro grupo importante dentro de los reguladores del crecimiento es el ácido giberélico (GA₃), el cual se ha utilizado en la inducción de brotes de *Chrysanthemum coronarium L.*, (Pooja *et al.*, 2021) y en la inducción de raíces adventicias de *C. morifolium var. Aboukyu*, GA₃ (Tanaka *et al.*, 2000).

Además de su efecto promotor en las respuestas morfogénicas, los reguladores del crecimiento como las auxinas y giberelinas, tienen una función importante en la regulación de las respuestas de defensa de la planta (Gravel *et al.*, 2007; Zhao y Li, 2021)

El ácido-3-indolacético (AIA), una auxina natural de las plantas, además de tener una función clave en los procesos de desarrollo y crecimiento (Benjamins y Scheres, 2008), se ha asociado a los mecanismos de defensa contra agentes biológicos (Al-Wakeel *et al.*, 2013). De hecho se encontró que un aumento en los niveles de AIA en hojas maduras de *Arabidopsis thaliana* reduce la concentración de *Tobacco mosaic virus*.

En el caso de GA₃, se ha reportado que interviene durante el establecimiento de las infecciones ocasionadas por el *Potato virus Y* (PVY) y *Rice grassy stunt virus* (RGSV) en *Solanum tuberosum*, (Križnik *et al.*, 2017) y *Oryza sativa* (Sato *et al.*, 2013), respectivamente. De acuerdo con Zhu *et al.* (2005) la aplicación exógena de GA₃ puede revertir los síntomas de enanismo causados por *Rice dwarf virus*.

Antioxidantes

Los antioxidantes se han empleado en el cultivo de tejidos para reducir la acumulación de compuestos fenólicos (Vijayalakshmi y Shourie, 2016).

El ácido ascórbico es una molécula antioxidante que reduce el daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (Pavet *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2008). Se ha reportado que este antioxidante tiene la capacidad de inhibir la replicación del *Turnip mosaic virus* (TuMV) en plantas de *Brassica rapa* (Fujiwara *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2011) lograron revertir los síntomas de la infección causada por *Cucumber mosaic virus*

en *Arabidopsis thaliana* cuando aplicaron de forma foliar 5 mM de ácido ascórbico. Wang *et al.* (2016) observaron que plantas de nabo que tienen el gen de resistencia (RnT1-1) al TuMV presentan altos niveles endógenos de ácido ascórbico. Cuando evaluaron el efecto del ácido ascórbico en plantas de nabo susceptibles a TuMV, las plantas mostraron una mayor resistencia que las plantas sin ácido ascórbico.

Por su parte, se ha encontrado que el ácido cítrico induce resistencia contra *Tobacco mosaic virus* (TMV) en tabaco (Basit *et al.*, 2021). También se ha reportado que la aplicación de ácido ascórbico y ácido ascórbico en *Cucumis sativum* var. Madina, *Hibiscus esculantus* var. Balady y *Capsicum annum* var. Roomy, reducen la incidencia de CMV, *Hibiscus chlorotic ringspot virus* y *Potato PVY* (Saleh *et al.*, 2021). Incluso hay reportes donde el ácido ascórbico y ácido cítrico han sido efectivos para el control de TSWV en *Solanum lycopersicum* L. (Bondok *et al.*, 2014).

Antibióticos

Los antibióticos se han utilizado comúnmente para reducir la contaminación de los explantes en el cultivo de tejidos, así como para seleccionar las células transgénicas en los protocolos de transformación genética. (Verma *et al.*, 2015).

La cefotaxima es un antibiótico de la familia de los B-lactámicos, que actúa a nivel del peptidoglicano, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana (Pollock *et al.*, 1983), y es poco tóxico para los tejidos vegetales. Tanto la cefotaxima como la ampicilina, tienen una estructura análoga a los reguladores del crecimiento vegetal y pueden actuar de manera similar promoviendo la morfogénesis (formación de brotes y

embriones somáticos) (Gerszberg y Grzegorzczak-Karolak, 2019; Mineykina *et al.*, 2020).

Se ha documentado que antibióticos como la cefotaxima y kanamicina pueden causar hipermetilación del DNA (Schmitt *et al.*, 1997) o alterar los estados de metilación (Bardini *et al.*, 2003).

Multiplicación de plantas libres de virus

Una vez que se obtienen las plantas libres de virus es necesaria su multiplicación clonal por cultivo de tejidos (micropropagación) con el fin de obtener un número suficiente de plantas sanas que puedan ponerse a disposición del productor.

La micropropagación ha permitido regenerar plantas a gran escala mediante dos rutas morfogénicas, la embriogénesis somática y la organogénesis (Ziv, 2005).

En la propagación de plantas a gran escala, la fase de multiplicación, es una etapa importante, ya que se requiere alcanzar un gran número de plantas en el menor tiempo posible (Yesmin *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2006). Además, los brotes regenerados deben cumplir con las características fisiológicas necesarias para sobrevivir a las condiciones *ex vitro*, durante la aclimatación (Hwang *et al.*, 2022).

Sistemas en medios semisólidos

La mayor parte de los protocolos de multiplicación de plantas utilizan medios de cultivo semisólidos (Imtiaz *et al.*, 2019; Samala *et al.*, 2017), ya sea para inducir la organogénesis o la embriogénesis somática (Mani y Senthil 2011; Hesami *et al.*, 2020).

La micropropagación en medios semisólidos implica el uso de agentes gelificantes en

recipientes pequeños, que requieren gran cantidad de mano de obra para su mantenimiento y producción. Aunado a esto, las bajas tasas de multiplicación de los brotes, las pérdidas del material vegetal por contaminación, así como los bajos porcentajes de supervivencia durante la aclimatación, han limitado el éxito de los protocolos desarrollados (Etienne y Berthouly, 2002; Georgiev et al., 2014). Estos factores además incrementan los costos de producción (Gatti *et al.*, 2017).

Debido a esto, se empezaron a desarrollar protocolos en medios de cultivo líquido, en donde los explantes tienen mayor superficie de contacto con los nutrientes, facilitando su absorción y crecimiento, sin embargo la aparición de anomalías e hiperhidratación en los brotes, debido a la alta humedad relativa dentro del sistema, han limitado también su aplicación a gran escala.

Ante estas dificultades en la micropropagación, se empezaron a desarrollar sistemas automatizados, llamados sistemas de inmersión temporal (Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.*, 1999).

Sistemas de inmersión temporal

Los sistemas de inmersión temporal automatizados (SIT) buscan reducir la manipulación, tiempos y costos de producción en los protocolos de multiplicación a gran escala (Aguilar *et al.*, 2019; Escalona *et al.*, 2007). Los biorreactores de inmersión temporal (SIT) evitan la exposición constante del explante al medio de cultivo, mediante un sistema que pone en contacto la planta con el medio de cultivo temporalmente, cada cierto período de tiempo (Mosqueda-Frómata *et al.*, 2017; Vives *et al.*, 2017). Después de cada ciclo de inmersión, el tejido vegetal es expuesto a un ambiente gaseoso,

beneficiándolo a un mejor intercambio de gases, sin limitaciones de oxígeno, lo que evita la aparición de brotes hiperhidratados (Georgiev *et al.*, 2014).

Existen al menos 3 diferentes tipos de SIT, que van de acuerdo al tamaño del frasco o recipiente, si tiene algún soporte de cultivo, si se implementa algún sistema computarizado para el control de los tiempos y frecuencias de inmersión, si utiliza bomba de aire o se ayuda del movimiento mecánico del frasco para el traslado del medio de cultivo, si recicla o no el medio, y si incorpora o no el recipiente del medio con el recipiente de cultivo (Etienne y Bertouly 2002).

En base a esto se han desarrollado sistemas como el tipo RITA, BioMINT y BIT (Alvard *et al.*, 1993; Escalona *et al.*, 1999; Robert *et al.*, 2006).

El sistema RITA fue uno de los primeros sistemas desarrollados, y esta compuesto por un solo recipiente, tiene dos compartimientos que se dividen por un soporte que separa a los explantes o brotes del medio de cultivo (Alvard *et al.*, 1993).

El sistema BioMINT fue desarrollado en México y funciona a partir de un solo recipiente, dividido en dos, con la característica que utiliza el movimiento mecánico por gravedad del recipiente, que impulsa el traslado del medio líquido hacia el compartimiento donde se encuentran los explantes o brotes (Robert *et al.*, 2006).

El sistema BIT está conformado por dos frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad cada uno, ambos frascos están conectados por dos mangueras de silicona que soportan la esterilización en autoclave, contiene también filtros de membrana de aire hidrofóbicos (0.2 μm), válvulas eléctricas y un compresor o bomba de aire (Figura 1).

El sistema funciona a través del suministro de aire del compresor o bomba, en el frasco

con el medio líquido. Debido a la presión ejercida dentro del frasco, el medio se desplaza hacia el recipiente que contiene los explantes o brotes. Esta función es controlada por un temporizador o computadora que regula el suministro de aire del compresor dirigido al sistema (Etienne y Bertouly, 2002).

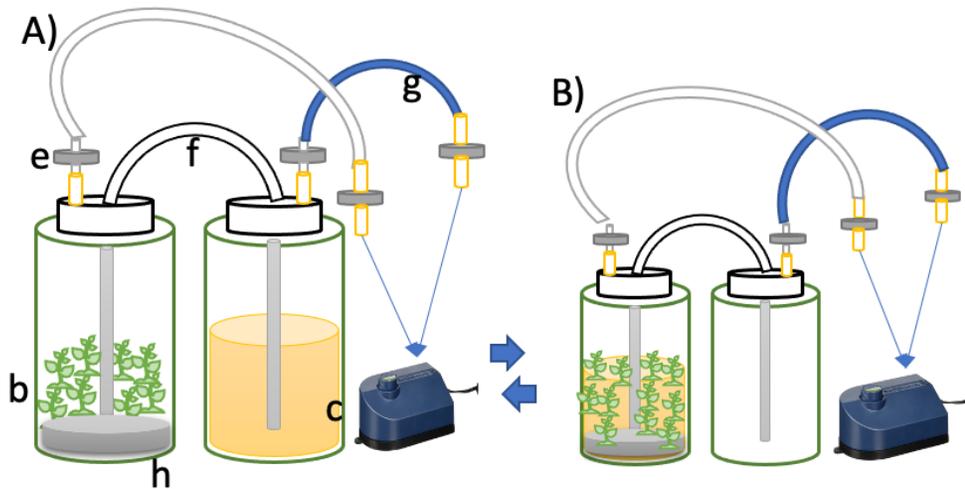


Figura 1. Diagrama esquemático de un sistema de inmersión temporal, vasos gemelos (BIT); **A) fase de secado (gaseosa)**; a) Explantes libres de virus; b) Frasco con brotes regenerados a partir de plantas libres de virus; c) frasco con medio líquido; d) filtros de membrana ; e) mangueras de silicona para el intercambio de medio de cultivo; g) mangueras para el flujo de aire; conectadas a la bomba h) soporte de poliuretano; **B) fase en inmersión. (Elaboración propia).**

Se ha reportado que los BIT han promovido la calidad de los brotes regenerados en estevia (*Stevia rebaudiana* B Morita II), además de aumentar la biomasa y el contenido de esteviol glucosidos, en comparación con los sistemas líquidos y semisólidos (Vives *et al.*, 2017). En anturio (*Anthurium andreun*), cuando se comparo un sistema de inmersión parcial (solo 5 mm de la base del explante se sumerge en el medio líquido), un sistema semisólido y un SIT normal, observaron que el SIT normal promovió el número de brotes por explante y el contenido de clorofila, además de la supervivencia durante la aclimatación (Martínez-Estrada *et al.*, 2019).

Determinar el ciclo de inmersión adecuado para cada especie vegetal, es fundamental para generar un gran número de plantas con una mejor calidad y en menor tiempo posible (Escalona, 2003; Albarran *et al.*, 2005; Martínez-Estrada *et al.*, 2019). Igualmente, la densidad de explantes en los recipientes y la cantidad de medio de cultivo juega un papel clave en la respuesta morfogénica (Hahn y Paek, 2005; Monja-Mio *et al.*, 2021).

Al respecto, Mosqueda-Frómeta *et al.* (2017) observaron que en *Gerbera jamesonii* una inmersión de 4 min cada 8 hrs era la óptima para evitar la hiperhidratación, debido a que cuando se aumentaba la frecuencia a 6 hrs, los brotes se hiperhidrataban. A diferencia, Martínez-Estrada *et al.* (2019) en anturio, no encontraron diferencias significativas en las variables morfológicas (número y largo del brote, número de hojas, peso seco y peso fresco) con respecto a los tiempos de inmersión. Por otra parte Monja-Mio *et al.* (2021) encontraron que una densidad de 20 plantas por 200 ml de medio en un sistema RITA (1L), era el adecuado para obtener el mayor número de brotes por planta (3.05) que cuando se utilizaba una densidad de 40 (1.33) en *Agave angustifolia* Haw.

En crisantemo existen pocos reportes del uso de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación de brotes. Los estudios de propagación a gran escala en crisantemo se desarrollaron a partir de protocolos que utilizaban biorreactores de transporte aéreo (airlift biorreactor, biorreactor de 10 L tipo columna), en el que las plantas, se mantenían sobre una red de soporte al contacto con el medio de cultivo líquido, sin sumergir a las plantas (Kim *et al.*, 2003; Hahn y Paek, 2005). También se evaluaron biorreactores tipo balón o globo de 10 L, en donde las plantas se mantenían con el medio de cultivo, con

intercambio de aire (Sivakumar *et al.*, 2005). De acuerdo con Hahn y Paek, el cultivo de 80 segmentos nodales en un biorreactor de columna de 10 L es factible dado la gran cantidad de brotes que se pueden obtener. A diferencia de Sivakumar que en un biorreactor de balón de 10 L, a una densidad de 60 explantes por biorreactor fue la mejor.

Más recientemente, Hwang *et al.* (2022) han reportado la eficiencia de un sistema de inmersión temporal SETIS TM. Este sistema funciona a partir de dos recipientes horizontales que están conectados uno por encima del otro. De acuerdo con sus resultados, este sistema mejoro la calidad de los brotes regenerados, en cuanto al largo, número de hojas y número de raíces. Sus observaciones histológicas indican que el área foliar y el área de la células epidermicas de las plantas regeneradas en SIT, son mayor a las obtenidas en los sistemas semisólidos, además de tener un xilema secundario más desarrollado. Estos resultados favorecieron el aumento de la supervivencia durante la aclimatación (Debergh *et al.*, 1992; Picoli *et al.*, 2001)

Métodos de detección de virus

Una vez que se obtienen las plantas presuntamente sanas mediante cultivo de tejidos, termoterapia o quimioterapia o la combinación de estas técnicas, es necesario verificar su sanidad. Las técnicas actuales de diagnóstico se dividen en procedimientos serológicos, moleculares y la combinación de ambos (Webster *et al.*, 2004).

Pruebas inmunológicas

Las técnicas serológicas o inmunológicas se basan en las propiedades antígenas de las proteínas virales, utilizando anticuerpos o inmunoglobulinas (Albouy *et al.*, 2000). La

técnica utiliza la capacidad de los anticuerpos generados en animales para reconocer proteínas, generalmente la proteína de la cápside del virus de interés (Webster *et al.*, 2004).

La técnica de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es la más empleada con este propósito; posee gran sensibilidad, pueden analizarse muchas muestras, utiliza una pequeña cantidad de antisueros, los resultados obtenidos son cuantitativos y el proceso puede programarse de manera automática, además de ser sencillos, rápidos y de bajo costos para la detección de infecciones virales (Wu *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). La principal limitación de esta técnica es el requerimiento de anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para cada virus de interés, que no reaccione de forma cruzada con las proteínas vegetales. Los antisueros pueden carecer de la sensibilidad para detectar aislamientos de virus que están estrechamente relacionados, pero que tienen un fenotipo distinto, a menudo porque el carácter determinante del aislamiento no se refleja en una variación de la proteína de la cápside. Sin embargo, pueden llegar a ser altamente impredecible y costoso (Boonham *et al.*, 2014).

Pruebas moleculares

RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

RT-PCR y PCR son técnicas frecuentemente utilizadas para la detección e identificación de virus de plantas de ARN y ADN, respectivamente. Los procedimientos son extremadamente sensibles. En el caso de los virus de ARN, mediante la RT-PCR, primero se sintetiza una cadena de ADN complementaria a la del virus con la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT). Los iniciadores, que flanquean parte del genoma del

virus, se extienden mediante una ADN polimerasa termoestable en una serie de pasos de desnaturalización y extensión que aumentan exponencialmente el número de copias del ADN objetivo. Para los virus de ADN, el paso RT es innecesario (Webster *et al.*, 2004).

Además de la detección de virus, una ventaja adicional de la PCR y la RT-PCR, es que el amplicón se puede secuenciar para proporcionar datos adicionales sobre la variabilidad genética de los aislamientos virales (Webster *et al.*, 2004).

PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CRISANTEMO LIBRES DE VIRUS POR CULTIVO DE TEJIDOS: UNA REVISIÓN

El crisantemo es una planta ornamental cuya demanda ha ido en aumento en el mundo y en México. Debido al color y diversidad de formas de sus flores, son utilizadas como flor de corte y maceta; siendo el segundo cultivo en importancia económica, después de la rosa (Teixeira da Silva *et al.*, 2013). En 2020, el cultivo de crisantemo alcanzó un valor de producción de 1.9 mil millones de pesos por encima de los 1.7 mil millones que generó el cultivo de la rosa (SIAP, 2020).

La principal vía de propagación en crisantemo es por esquejes, método que da lugar a la transmisión de plagas y enfermedades causadas por insectos, hongos (Zhu *et al.*, 2010), bacterias (Végh *et al.*, 2014) y virus (Verma *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2011). La incidencia de plagas y enfermedades, incrementan los costos durante todo el ciclo de producción (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2015).

Las enfermedades virales han provocado grandes pérdidas en el rendimiento del crisantemo, limitando el desarrollo sostenible de su producción (Yan *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021), ya que pueden reducirla en un 10 a 30 % (Verhoeven *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 2011).

La propagación de plantas libres de enfermedades es una necesidad inminente, con el fin de garantizar la producción de material certificado y controlar las enfermedades virales (Previati *et al.*, 2008; Krczal *et al.*, 1998). Ante esta necesidad, el cultivo de tejidos, mediante el cultivo de meristemas, en combinación con termotarapia y quimioterapia, surge como una alternativa eficaz para la erradicación de virus (Smith *et al.*, 2017).

Asimismo, el cultivo de tejidos en combinación con el uso de biorreactores ha permitido aumentar las tasas de multiplicación de plantas de distintos cultivos (banano, manzano y gerbera), reduciendo los costos de producción, mano de obra y tiempo para la propagación masiva (Aka-kaçar *et al.*, 2020; Shahzad *et al.*, 2017).

Esta revisión tiene como objetivo describir los estudios relacionados con las técnicas utilizadas para la generación de plantas libres de virus, así como para la producción masiva de plantas libres de virus del género *Chrysanthemum* mediante el cultivo de tejidos.

Principales virus que afectan al cultivo de crisantemo

Las enfermedades virales son un problema recurrente en el sistema de producción de crisantemo. Dentro de los virus más importantes, se destacan el *Tomato aspermy virus* (TAV) que causa mosaico amarillo en hojas y deformación en flores (Raj *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2015) y se ha reportado que reduce el 5 y 10 % de la longitud del tallo y el tamaño de la flor (Horst 1990), *Chrysanthemum B virus* (CBV) que induce síntomas de mosaico, manchas anulares, amarillamiento y moteado en hojas (Supakitthanakorn *et al.*, 2021), *Cucumber mosaic virus* (CMV) que causa mosaico y manchas anulares en hojas y deformaciones en la flor, ocasionando perdidas en la calidad y cantidad de flores (Kumar, 2009), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) que causa moteado clorótico y necrosis en hojas (Kondo *et al.*, 2011), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) que ocasiona lesiones necróticas en tallos, manchas y anillos cloróticos y necróticos en hoja, además de distorsiones en la hoja (Matsuura *et al.*, 2007) y por último el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) que produce síntomas de marchitamiento del tallo, manchas cloróticas

y necroticas en hojas, deformación y reducción del número de flores (Horst y Nelson, 1997; Chung *et al.*, 2006).

El *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) se encuentra entre los virus fitopatógenos más importantes en el cultivo de crisantemo, por las pérdidas económicas que ocasiona, la complejidad de la interacción virus-vector-planta, sus características genéticas y biológicas, y su amplia distribución (Scholthof *et al.*, 2011; Rybicki, 2015). Se ha reportado que el TSWV puede ocasionar perdidas por más de 2.7 millones dolares al año (Alvarez-Díaz *et al.*, 2019). En México se ha estimado que el TSWV provoca perdidas de hasta un 90% en plantaciones de crisantemo (Ochoa-Martínez *et al.*, 1999).

Técnicas para la erradicación de virus en crisantemo

Cultivo de meristemas

Uno de los métodos de propagación de plantas de crisantemo más utilizados es el enraizamiento de esquejes; no obstante, este método consume tiempo, requiere de gran cantidad de mano de obra y no garantiza la sanidad del material generado (Texeira *et al.*, 2013; Wise *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2020; Matsuura *et al.*, 2004). El cultivo de tejidos, mediante las técnicas del cultivo de meristemas y la micropropagación, permite generar individuos que son clones de la planta madre, genéticamente estables y libres de enfermedades virales. (Kazeroonian *et al.*, 2018; Jeon *et al.*, 2012).

El cultivo de meristemas consiste en la disección del tejido meristemático (meristemo) que se encuentra en la punta de los brotes o vástagos. Se ha propuesto que los meristemas no tienen conexión vascular con el resto de la planta, lo que dificulta el transporte de las partículas virales hasta esa región (Bhojwani y Dantu, 2013).

Asimismo, las células de los meristemas se dividen más rápidamente y tienen una actividad metabólica más alta que otro tipo de células en la planta, limitando con ello la replicación viral (Parmessur y Saumtally, 2002; Bhojwani y Dantu, 2013). También se ha propuesto que en los meristemas, se lleva a cabo el silenciamiento génico por RNA, que es un mecanismo de escape a la infección viral (Parmessur y Saumtally 2002; Foster *et al.*, 2002). Se ha reportado, que en plantas de *Nicotiana benthamiana*, la enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR6) regula la exclusión del Potato virus X en los meristemas (Schwach *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el desencadenante de este proceso se inicia en las zonas de origen de infección (Medzihradzsky *et al.*, 2019).

El éxito del cultivo de meristemas radica en varios factores, pero uno de los más importantes es el tamaño del meristemo, ya que se ha observado que entre más pequeño sea, mayor probabilidad de que los brotes regenerados estén libres de virus (Ramgareeb *et al.*, 2010). De igual forma la posición del meristemo en la planta madre, así como su edad fisiológica, la presencia de organismos endófitos, su supervivencia en el medio de cultivo y la velocidad de crecimiento de las plantas generadas, influirán en el éxito de esta técnica (Cha-um *et al.*, 2006).

El cultivo de meristemas ha resultado ser una herramienta útil en la erradicación de distintos virus como el *Potato virus Y* (PVY) y *Potato virus S* (PVS) en papa (*Solanum tuberosum*) (Ali *et al.*, 2013; Waswa *et al.*, 2017), el *Sugarcane yellow leaf virus* en caña (*Saccharum officinarum*) (Madugula y Gali, 2017), el *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) y el *Apple stem pitting virus* (ASPV) en manzano (*Malus domestica*) (Kim *et*

al., 2017), así como el *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) y *Strawberry mottle virus* (SmoV) en fresa (Quiroz *et al.*, 2017).

Los primeros reportes del cultivo de meristemo en crisantemo fueron realizados por Mori (1971), el cual utilizaba un tamaño de meristemo de 0.2-1 mm. Posteriormente Sangwan *et al.* (1987) mencionaron que el tamaño óptimo para la formación de brotes en crisantemo era de 3-5 mm con 2 y 4 primordios foliares.

En *Crisantemo morifolium* L. var. Regol Time, Verma *et al.* (2004) reportaron que un tamaño de meristemo de 0.3 mm fue suficiente para obtener más del 70 % de plantas libres del *Cucumber mosaic virus* (CMV). Sin embargo, Ram *et al.* (2005) señalan que no fue posible eliminar el *Chrysanthemum B carlavirus* (CVB) cuando se cultivaron meristemos de crisantemo de 0.3 mm en la misma variedad. Por su parte, Ram *et al.* (2009) mencionan que la eliminación del *Tomato aspermy virus* (TAV) en *C. morifolium* L. var. Regol Time, mediante el cultivo de meristemos, fue sumamente difícil, ya que solo 35 % de plantas regeneradas fueron libres del virus. En contraste, Kumar *et al.* (2009) obtuvieron 65.6 % de plantas libres del TAV y de CMV en *C. moriflroum* L. var. Pooja.

Dado el bajo porcentaje de plantas libres de virus que se han obtenido en algunas variedades de crisantemo mediante el cultivo de meristemos, ésta técnica se ha complementado con otras como la termoterapia y quimioterapia, con el objeto de aumentar el número de plantas sanas.

Termoterapia in vitro

La termoterapia ha sido una técnica utilizada para la eliminación de virus en plantas de distintas especies, incluyendo crisantemo (Verma *et al.*, 2004; Ram *et al.*, 2005). La termoterapia consiste en exponer la planta madre cultivada en invernadero o *in vitro* a temperaturas de 30 a 40 °C, por periodos cortos que van desde unos minutos hasta varios días (Křížan *et al.*, 2009). La termoterapia se fundamenta en que a temperaturas altas, la síntesis de RNA viral disminuye o se inhibe, reduciendo el número de partículas virales (Wang *et al.*, 2008). Es factible combinar la termoterapia con el cultivo de meristemos, en este caso, la planta se expone a temperaturas altas, para posteriormente disectar los meristemos y cultivarlos *in vitro* en un medio nutritivo. Esta modalidad ha permitido generar plantas libres de virus en manzano (Hu *et al.*, 2019), lirio (*Lilium x elegans* Thunb) (Nesi *et al.*, 2009) y papa (Ali *et al.*, 2013). En plantas ornamentales como el gladiolo (*Gladiolus sp*) se ha reportado que la combinación del cultivo de meristemos con termoterapia, genera más del 80 % de plantas libres del *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) (Sharifi *et al.*, 2015). En *Rosa damascena*, la producción de plantas libres de *Apple mosaic virus* (ApMV) y *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV) se ve favorecida más de un 90 % cuando se combina la termoterapia y el cultivo de meristemos (Aljuaid *et al.*, 2022).

En crisantemo los primeros reportes, que combinaban termoterapia con el cultivo de meristemos, se desarrollaron para la eliminación de los virus CBV y TAV (Hakkaart y Quak, 1963; Paludan, 1973). Estos trabajos aplicaban temperaturas de 37-38°C antes del cultivo de meristemos, por periodos de 10 hasta 60 días con resultados de hasta el 98 % y 74 % de plantas libres de los virus CBV y TAV. Asatani (1972) encontró que la

aplicación del cultivo de meristemo con o sin tratamiento de temperatura de 38°C, resultaba en la eliminación de los virus CBV y TAV en plantas de crisantemo variedades Hakuho, Bansei-Alps, Unaruga y Fuku-un.

Budiarto (2011) más recientemente, en *C. morifolium* variedades Stroika, Dewi sartika y White fiji, observó que exponer las vitroplantas a 38-40 °C durante tres semanas, y luego disecar y cultivar sus meristemas, generó 100 % de plantas libres del virus CMV. En contraste, Ram *et al.* (2005) reportaron que cuando las plantas de crisantemo var. Regol time, fueron sometidas a 38 °C durante 30 días, seguido del cultivo de meristemas, solo el 20 % de las plantas regeneradas fueron libres del virus CVB.

Otra modalidad de esta técnica, consiste en generar las plantas mediante el cultivo de meristemas y luego someter dichas plantas a la termoterapia; no obstante, esta opción ha sido menos efectiva (Ram *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que en plantas de *C. morifolium* variedad Mistletoe, después de obtener plantas libres de *Chrysanthemum stunt virus* (CSV) por termoterapia (35°C) seguido del cultivo de meristemo, volvían a presentar los síntomas de atrofia y enanismo del virus, después de 27 semanas en campo (Hollings y Stone, 1970).

Ali *et al.* (2013) señalan que el éxito de esta técnica dependerá igualmente del tamaño del meristemo, la naturaleza del virus, la especie vegetal, la temperatura y duración del tratamiento .

Quimioterapia

La quimioterapia aplicada al cultivo *in vitro* se ha reportado como una técnica eficaz para la eliminación de virus en plantas ornamentales propagadas vegetativamente como lirios, orquídeas, begonias, gladiolas y crisantemo (Panattoni *et al.*, 2013). Los agentes antivirales se pueden aplicar a la planta madre o agregar al medio de cultivo, y con ello inhibir la replicación del virus (Klein y Livingston 1983). Los compuestos antivirales se han descrito como antimetabolitos que tienen la capacidad de inhibir la síntesis del genoma viral (Hansen y Lane 1985). Productos como la ribavirina (RBV) se han utilizado para eliminar el virus CMV en gerbera (Gautam *et al.*, 2017), y la combinación de éste con oseltamivir (OST) fue efectiva para reducir los efectos del *Grapevine Fleck Virus* (GFkV) en vid (GUȚĂ *et al.*, 2014). Asimismo, compuestos como el Tiazofurin (TZ) y RBV tienen la capacidad de inhibir la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) y con ello eliminar el *Grapevine Leaf Roll Virus* (GLRV), que afecta al cultivo de la vid (Panattoni, 2011). La enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tiene un papel importante en la biosíntesis de guanina que se requieren durante los procesos de transcripción y traducción (Allison y Eugui 2000). Se ha reportado que RBV y TZ interfieren en la conversión de NAD/NADH, lo que sugiere que la actividad de IMPDH se ve afectada (Panattoni *et al.*, 2015)

Además de la RBV, otros compuestos como el 2-thiuracilo (2TH) han resultado efectivos para controlar al *Plum pox virus* (PPV) en ciruelo (Jakab-Ilyefalvi *et al.*, 2012). En crisantemo, se han evaluado compuestos antivirales como el 2TH, brotes obtenidos a partir de meristemos se colocaron en un medio de enraizamiento que contenían 2-

thiuracilo y posteriormente fueron incubados a 38°C; no obstante, solo 26 % de las plantas regeneradas fueron libres del CVB (Ram, 2005).

Existen reportes en los que ha comparado el efecto de agentes antivirales como el clorhidrato de amantadina, aciclovir y RBV, siendo la RBV complementada con la termoterapia, la que permitió obtener el mayor porcentaje (51%) de plantas de *C morifolium* L. var. Regol time, libres del TAV (Ram *et al.*, 2009). Budiarto *et al.*, (2011) reportaron que un tratamiento con RBV, seguido del cultivo de meristemas permitió obtener 100% de plantas libres de CVB en plantas de crisantemo var. Dewi sartika, Sarawasti y Yellow fiji.

Cabe mencionar que los antivirales pueden llegar a ser tóxicos cuando se emplean en concentraciones altas y afectar el crecimiento de las plantas tratadas, o ser ineficaces cuando se usan en dosis bajas, o generar resistencia (Hansen y Lane 1985; Cieslińska 2007; Yang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2003). Lo anterior, ha llevado a los investigadores a recomendar el uso combinado de la quimioterapia, termoterapia y cultivo de meristemas para erradicar las infecciones virales de manera más efectiva.

Propagación masiva de plantas de crisantemo libres de virus

La micropropagación es una de las técnicas del cultivo de tejidos que permite producir, plantas libres de enfermedades a partir de un órgano, un segmento de tejido o un grupo de células, en un periodo de tiempo corto, conservando las características genéticas de la planta madre (Quiroz *et al.*, 2017). En distintas variedades de crisantemo (Euro, Autumn Queen, Zembla yellow, Brighton, Dark Orange Cupertino, Dark Roanoke,

Hudson Bay, Ivory Eugene, y Tahoe) se han desarrollado protocolos para su micropropagación, ya sea por la vía de la embriogénesis (Naing *et al.*, 2013) o por la organogénesis (Mehedi *et al.*, 2020; Babiker *et al.*, 2021; Valle-Sandoval *et al.*, 2008; Chowdhury *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2011) con diferentes tipos de explante y combinación de reguladores.

Mehedi *et al.* (2020) informaron que los ápices generan un mayor número de brotes por explante que las hojas, en un medio compuesto por las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2.5 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de KIN, teniendo una mayor altura y número de hojas por brote. Valle-Sandoval *et al.* (2008) mencionan que los explantes de tallo de crisantemo variedad Indianápolis, cultivados en un medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BA más 1.8 mg L⁻¹ de AIA, tienen mayor capacidad de regeneración que los explantes de hoja y peciolo. Igualmente, Lim *et al.* (2012) reportaron que los tallos de once variedades de crisantemo (Manardu, Pink pride, Chopin, Mona-Liza, Euro, Borami, Yes time, Yes nuri, Crown, Yes star y Moon light) tuvieron mayor capacidad de regeneración que los explantes de hojas, excepto para la variedad Borami que tuvo mayor frecuencia de brotes a partir de hojas. De hecho, se ha reportado que en las variedades BARI Chry-2 y Yellow (nativa de Bangladesh), los explantes de hoja producen un mayor número de brotes, en un medio compuesto por 0.5 mg L⁻¹ de BA y 2 mg L⁻¹ de AIA (Chowdhury *et al.*, 2021). De manera similar Kazeroonian *et al.* (2018) reportaron en la variedad Resomee splendid, que los explantes de hoja tienen mayor porcentaje de iniciación de brotes que los explantes de peciolo, cultivados en MS con 4.5 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de ANA. Incluso se ha

observado que los pétalos generan una mayor frecuencia de brotes por explante, en un medio compuesto solo por 1.5 mg L⁻¹ de BA (Song *et al.*, 2011)

Los protocolos desarrollados para la multiplicación de brotes se han enfocado a la utilización de segmentos nodales con una o dos yemas axilares. Se ha reportado que la adición única de Benziladenina (BAP) ha sido suficiente para la multiplicación de brotes de crisantemo (Samala *et al.*, 2016; Imtiaz *et al.*, 2019), sin embargo en otros estudios el mayor número de brotes alcanzado ha sido con una combinación de ácido indolacético (AIA) y kinetina (KIN) (Song *et al.*, 2011).

Al respecto, Khan *et al.* (2020) informan que los segmentos nodales tienen un alto porcentaje de formación de brotes en un medio compuesto por 2 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de AIA. Borodulina *et al.* (2019) encontraron un mayor número de brotes en un medio (MS) compuesto por 0.21 mg L⁻¹ de KIN más 0.04 mg L⁻¹ de AIB, a partir de segmentos nodales de vitroplantas.

Las diferencias en la respuesta morfogénica, dependiendo el tipo de explante, se le ha atribuido a los niveles endógenos de auxinas dentro de la planta, los cuales interactúan con los reguladores de crecimiento exógenos (Kaul *et al.*, 1990). El uso de citocininas y auxinas, de manera independiente o juntas, pueden lograr la regeneración de brotes. Las citocininas actúan de manera sinérgica y son altamente dependientes. Las variaciones en los niveles de concentración de citocininas llegan a provocar un aumento en los niveles de auxinas endógenas, estimulando la desdiferenciación (Harberer y Kieber 2002).

Debido a esto, Teixeira y Kulus (2014a) señalaron que la regeneración de brotes de crisantemo está sumamente influenciada por las condiciones de cultivo, tipo de explante y genotipo de la planta madre. Por lo tanto se hace necesario realizar protocolos específicos por cada variedad y genotipo, en una etapa fisiológica determinada.

Aunado a esto la micropropagación por métodos convencionales del cultivo semisólido, ha presentado limitantes en cuanto la eficiencia de multiplicación, además de tener un costo muy elevado por el uso de agentes gelificantes (Teixeira 2014b).

La multiplicación de los brotes regenerados, es una de las etapas más importantes en la micropropagación, debido a que ésta etapa tiene como objetivo producir un gran número de brotes en el menor tiempo posible (Yesmin *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2004). Dichos brotes deberán poseer las características genéticas y fisiológicas que les permita sobrevivir a las condiciones *ex vitro*, durante la aclimatación (Hwang *et al.*, 2022).

La micropropagación de manera convencional se ha llevado a cabo utilizando medios semisólidos que contienen un agente gelificante; no obstante, las bajas tasas de multiplicación de los brotes, el alto costo de los componentes del medio de cultivo (especialmente el gelificante), las pérdidas del material vegetal por contaminación, el requerimiento de mano de obra, así como los bajos porcentajes de supervivencia durante la aclimatación, han limitado el éxito de los protocolos desarrollados (Berthouly y Etienne 2005; Georgiev *et al.*, 2014).

Con el objetivo superar las limitantes a las que se enfrenta la micropropagación convencional en medios semisólidos, se han desarrollado sistemas de inmersión temporal automatizados (SIT), que permiten aumentar las tasas de multiplicación, así como disminuir las pérdidas de material vegetal por manejo, los requerimientos de mano de obra, reducir los tiempos y los costos de producción (Aguilar *et al.*, 2019; Escalona *et al.*, 2007).

Multiplicación en biorreactores

Los sistemas o biorreactores de inmersión temporal (SIT) se han utilizado para la multiplicación a gran escala de especies como estevia (*Stevia rebaudiana*), manzano (*Malus domestica*), anturio (*Anthurium andreum*), gerbera (*Gerbera jasmonii*), pera (*Pyrus communis* L), agave (*Agave angustifolia*), piña (*Anana comosus* L. Merr), banano (*Musa AAB*), chile (*Capsicum chinense* Jacq.) (Vives *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2020; Martínez-Estrada *et al.*, 2019; Monja-Mio *et al.*, 2021; Lotfi *et al.*, 2020; Escalona *et al.*, 1999; Bello-Bello *et al.*, 2019). En los SIT las plantas se sumergen temporalmente en un medio de cultivo líquido, para que absorban los nutrientes, luego el medio es retirado para la renovación del ambiente en cada fase de inmersión (Teisson y Alvard 1995; Gomez *et al.*, 2017).

En crisantemo var. Cheonsu, Hahn y Paek (2005) compararon tres tipos de biorreactores, obteniendo mayor peso fresco, longitud del tallo, diámetro del tallo y número de hojas por planta en un sistema de flujo profundo (DFT), el cual se basa en la aplicación del medio de cultivo de manera continua debajo de los explantes. También evaluaron la densidad de explantes inoculados en recipientes de 10 L, encontrando que

una densidad máxima de 80 explantes, favorece la multiplicación. Por su parte, Hwang *et al.* (2022) probaron un sistema de inmersión temporal tipo SETIS, compuesto de un recipiente superior, que contenía las plantas, y un recipiente inferior el cual contenía el medio líquido, para la multiplicación de brotes de la variedad 'Golden bel de crisantemo. Los autores encontraron que la altura, el número de hojas, el peso fresco y longitud de las raíces fue mayor en este sistema, que en los convencionales con medio semisólido y líquido.

La propagación masiva de plantas de crisantemo se ha implementado principalmente en medios semisólidos y líquidos, y en menos frecuencia en biorreactores basados en sistemas de inmersión temporal. Por lo que la producción masiva en biorreactores es un campo de estudio por explorar.

Conclusiones

El aumento en la demanda de flores de crisantemo con calidad fisiológica y fitosanitaria que cubra las demandas del mercado hace necesario implementar técnicas como el cultivo de tejidos para la propagación masiva de plantas sanas.

La integración de técnicas de eliminación de virus y de micropropagación de plantas libres de virus a gran escala mediante biorreactores, ha permitido desarrollar protocolos de propagación masiva a escala comercial.

CAPÍTULO I. NUEVO PROTOCOLO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CRISANTEMO LIBRES DEL *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV)

1.1. RESUMEN

El crisantemo es una planta ornamental cuya demanda ha ido en aumento en México y el mundo; no obstante, las enfermedades virales le ocasionan pérdidas considerables. El cultivo de meristemas es una técnica que ha permitido obtener plantas libres de virus en distintos cultivos, pero dicha técnica consume tiempo y mano de obra, siendo necesario buscar alternativas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de estos compuestos de forma individual o combinada, sobre la regeneración de plantas de *Chrysanthemum morifolium* var. Harman, libres del *Tomato spotted wilt virus*, a partir de segmentos nodales. Nudos de plantas infectadas con TSWV, se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog que contenía antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico), reguladores del crecimiento vegetal (ácido giberélico, ácido indol-3-acético) y antibióticos (cefotaxima, ampicilina), de manera combinada o independiente. La sanidad de las plantas obtenidas fue verificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción (RT-PCR). Los medios suplementados con una combinación de antioxidantes, reguladores y antibióticos indujeron el mayor número de plantas por explante (1.8); 88.9 % de las plantas regeneradas bajo estas condiciones estaban libres del virus. Al evaluar de forma independiente, los antioxidantes, reguladores y antibióticos, en el 100 % de las plantas obtenidas en el medio que solo contenían antibióticos no se detectó el TSWV. Cultivar segmentos nodales en presencia de antibióticos o una combinación de éstos con reguladores de crecimiento y antioxidantes representa una alternativa viable para la producción de plantas de crisantemo libres del TSWV.

Palabras claves: *C. morifolium*, plantas libres de virus, TSWV, antioxidantes, antibióticos, reguladores de crecimiento

NEW PROTOCOL FOR THE REGENERATION OF CHRYSANTHEMUM PLANTS FREE OF *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV)

1.2. ABSTRACT

Chrysanthemum is an ornamental plant whose demand has been increasing in Mexico and the world; however, viral diseases cause considerable losses. Meristem culture is a technique that has made it possible to obtain virus-free plants in different crops, but this technique is time-consuming and labor-intensive, making it necessary to look for alternatives. The objective of this research was to develop a protocol to obtain chrysanthemum plants free of Tomato spotted wilt virus (TSWV). Nodal segments of plants infected with TSWV were grown in Murashige and Skoog medium containing antioxidants (ascorbic acid, citric acid), plant growth regulators (gibberellic acid, indole-3-acetic acid), and antibiotics (cefotaxime, ampicillin), in combination or independently. The health of the plants obtained was verified by retrotranscription polymerase chain reaction (RT-PCR). Media supplemented with a combination of antioxidants, regulators and antibiotics induced the highest number of shoots per explant (1.8); 88.9 % of the plants regenerated under these conditions were virus-free. When antioxidants, regulators, and antibiotics were evaluated independently, in 100 % of the plants obtained in the medium containing only antibiotics, TSWV was not detected. Growing nodal segments in the presence of antibiotics or a combination of antibiotics with growth regulators and antioxidants represent a viable alternative for the production of TSWV-free chrysanthemum plants.

Keywords: *C. morifolium*, virus-free plants, TSWV, antioxidants, antibiotics, growth regulators.

1.3. INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Chrysanthemum moriflorun* L) es uno de los principales cultivos ornamentales en México (SIAP 2020) y el mundo (Teixeira *et al.*, 2013). Utilizado como flor de corte y planta de maceta, este cultivo se ve afectado por enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus (Trolinger *et al.*, 2017). Los métodos de propagación vegetativa son una vía de transmisión de enfermedades virales, que reducen el rendimiento, la producción y calidad de la flor, además de aumentar los costos de producción (Matsuura *et al.*, 2004; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2015). El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) es uno de los virus más importantes en este cultivo, debido a que puede causar pérdidas de hasta un 90 % en las plantaciones (Ochoa-Martínez *et al.*, 1999; Rybicki, 2015).

El cultivo de tejidos (cultivo de meristemos) ha sido la herramienta más utilizada para la regeneración de plantas libres de virus (Smith *et al.*, 2017). El cultivo de meristemos, o su combinación con la termoterapia y quimioterapia, han permitido obtener plantas libres de virus en crisantemo y en otras especies ornamentales (Ram *et al.*, 2005). No obstante, la disección de los meristemos es una actividad que consume tiempo y mano de obra. Asimismo, el éxito de esta técnica depende del tamaño del meristemo, la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación; lo que ha impedido en algunos casos, producir la cantidad suficiente de plantas libres de virus (Ram *et al.*, 2009).

Algunos componentes empleados en los medios de cultivo como los reguladores del crecimiento, antibióticos o antioxidantes pueden generar las condiciones para obtener

plantas libres de virus, utilizando propágulos distintos a los meristemos, y de esa manera superar las limitantes del cultivo de meristemos (Zhu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011).

Los reguladores del crecimiento vegetal son necesarios para el desencadenamiento de los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Bhojwani y Dantu, 2013), pero, además, los reguladores como el ácido giberélico (AG₃) y el ácido indol-3-acético (AIA), participan en las cascadas de señalización en respuesta a las infecciones por virus (Satoh *et al.*, 2013; Križnik *et al.*, 2017). De igual manera, los antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico pueden inhibir la replicación viral o inducir la expresión de genes de resistencia (Fujiwara *et al.*, 2013; Basit *et al.*, 2021). Por su parte, los antibióticos como ampicilina (Amp) y cefotaxima (Amp), además de controlar la contaminación por bacterias en los cultivos, promueven la hipermetilación del DNA (Schmitt *et al.*, 1997), la cual ha sido descrita como un mecanismo de protección contra virus (Boyko *et al.*, 2007).

Dado que no se conocen reportes relacionados con el uso de antibióticos, antioxidantes y reguladores de crecimiento, para obtener plantas de libres de virus en crisantemo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de estos compuestos de forma individual o combinada, en el medio de cultivo, sobre la regeneración de plantas de crisantemo variedad Harman, libres del *Tomato spotted wilt virus*.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas madre de crisantemo variedad Harman, con síntomas de infección por el TSWV (necrosis en el tallo), fueron recolectadas en un invernadero localizado en San Nicolás Tlaminca, Texcoco, Estado de México. Las plantas se analizaron mediante la reacción

en cadena de la polimerasa por retrotranscripción (RT-PCR), para confirmar la presencia del TSWV.

1.2.1 Detección del virus por RT-PCR

El RNA total se extrajo de hojas jóvenes de plantas con síntomas de necrosis en el tallo, con el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la retrotranscripción (RT-PCR), un microlitro del RNA total se incubó a 70 °C por 5 min con 0.6 µL de cada uno de los iniciadores TSWV-1 y TSWV-2 (5'-TTCAGAAGGCTTGATAGC-3' y 5'-CAAGCAAGTTCTGCGAG-3'), para su alineamiento. La síntesis del cDNA, se llevó a cabo con la enzima M-MLV (Promega), para la cual se preparó una mezcla de RT que contenía 0.5 µL de dNTP's, 0.5 µL de M-MLV y 2 µL del amortiguador de reacción, para un volumen final de 10 µL. La RT-PCR se llevó a cabo a 42 °C por 60 min y 72 °C por 10 min.

Una vez generado el cDNA, se preparó la mezcla de reacción de la PCR de punto final, con 0.1 µL de la enzima Taq-pol (GoTaq PROMEGA), 0.2 µL de dNTP's, 2 µL de amortiguador de reacción (Green GoTaq PROMEGA), 0.6 µL de cada uno de los iniciadores TSWV-1 y TSWV-2, 5.5 µL de agua destilada y 1 µL del cDNA (volumen final de 10 µL). La desnaturalización se llevó a cabo a 94 °C por 2 min, el alineamiento a 51 °C por 30 s, la elongación 72 °C por 1 min y la elongación final a 72 °C por 7 min, durante 35 ciclos. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y el gel se tiñó con bromuro de etidio.

1.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV

1.2.2.1 Desinfestación del material vegetal

Esquejes obtenidos de plantas (10 a 15 cm) que resultaron positivas al TSWV después de la RT-PCR, fueron colocados en una solución fungicida-bactericida (2 g L⁻¹ de Promyl® y 2 g L⁻¹ Fungimycin®) por 20 min. Posteriormente, a esta solución se le agregó una gota de nanopartículas de plata (AgROVIT-CP®), y permanecieron por 15 min más. Luego, los esquejes se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) (1.2 % de ingrediente activo) por 15 min, y se enjuagaron con agua destilada esterilizada (4-5 veces). Nudos con una yema (1 cm) se obtuvieron a partir de los esquejes desinfectados y se colocaron en los distintos medios de cultivo probados.

Se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de antibióticos, antioxidantes y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, en la regeneración de plantas libres de TSWV.

1.2.2.2 Experimento 1. *Efecto combinado de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV*

En este experimento se evaluó el efecto combinado de antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico), reguladores de crecimiento (ácido indol-3-acético, ácido giberélico) y antibióticos (cefotaxima, ampicilina) utilizando los medios MS-AAR, MS-AOX1 y MSAOX, cuya composición se muestra en el Cuadro 1.

1.2.2.3 Experimento 2. Efecto independiente de antioxidantes, reguladores de crecimiento y antibióticos en la regeneración de plantas libres del TSWV

Se probó en forma independiente el efecto de los reguladores de crecimiento, los antibióticos y los antioxidantes. Los medios utilizados fueron: MS-AAR, MS-REG, MS-ANT, MS-AOX y MS-50 (sales basales de Murashige y Skoog solamente) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en el primero y segundo experimentos, para probar el efecto de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes, en la regeneración de plantas de crisantemo var. Harman, libres del TSWV.

Componentes	Medios				
	MS-AAR	MS-AOX	MS-AOX1	MS-ANT	MS-REG
Antioxidantes	AA, 100	AA, 100	AA, 100		
(mg L ⁻¹)	AC, 200	AC, 200	AC, 200		
Reguladores	AG ₃ , 1		AG ₃ , 1		AG ₃ , 1
(mg L ⁻¹)	AIA, 0.5		AIA, 0.5		AIA, 0.5
Antibióticos	Cft, 250			Cft, 250	
(mg L ⁻¹)	Amp, 250			Amp, 250	

AG₃: ácido giberélico; AIA: ácido indol-3-acético; AA: ácido ascórbico; AC: ácido cítrico; Cft: cefotaxima; Amp: ampicilina.

Los medios utilizados en los dos experimentos, se elaboraron con las sales de Murashige y Skoog (MS, 1962) al 50 %, 2 % de sacarosa y phytigel (2.3 g L⁻¹) como agente

gelificante; el pH se ajustó a 5.7 ± 1.0 . Los medios se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 20 min; los antibióticos se agregaron después de la esterilización. Después de siete días de cultivo, los explantes de los experimentos 1 y 2 fueron transferidos a los mismos medios de cultivo, pero sin antibióticos. Veintiún días más tarde se cuantificó el número de explantes que formaron brotes y el número de brotes por explante. Asimismo, se evaluó el número de plantas libres de virus mediante la técnica RT-PCR descrita anteriormente.

Los productos amplificados de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea) para confirmar que pertenecían al TSWV. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del *GeneBank* mediante el análisis de BLAST.

1.2.3 Diseño experimental

En el primero y segundo experimentos se utilizó un diseño completamente al azar con tres y cinco tratamientos, respectivamente, y 10 repeticiones por tratamiento, siendo un frasco con dos explantes una unidad experimental. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba Tukey (0.05). Para los datos obtenidos en la RT-PCR, se utilizó una prueba no paramétrica chi cuadrada X^2 , a partir de tablas de contingencia y se calculó el coeficiente v de Cramer. Ambos análisis se realizaron con el programa estadístico Rstudio versión 4.1.2.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Detección de TSWV en plantas de crisantemo var. Harman

La prueba de RT-PCR amplificó una banda de 501 pb, en las plantas de crisantemo var. Harman que presentaban síntomas de necrosis en el tallo (Figura 2). Las secuencias de los productos de la PCR analizados por BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostraron 98.86 % de identidad con el gen N que codifica a la proteína de la cápside del TSWV.

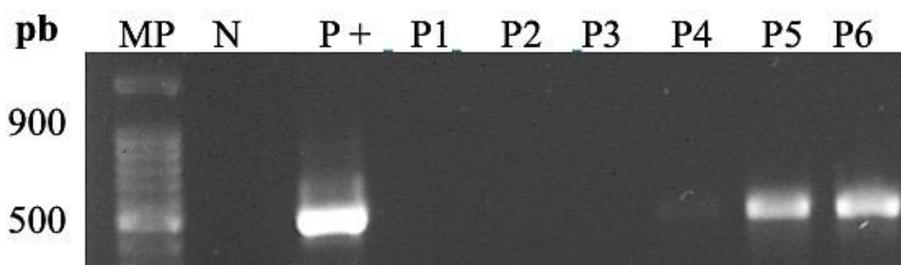


Figura 2. Detección del TSWV por RT-PCR (amplicón 501 pb) en *Chrysanthemum morifolium*. Plantas madre infectadas, carriles P4, P5 y P6. MP: marcador de peso molecular (1000-100 pb); N: testigo negativo; P: testigo positivo.

2.3.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres de TSWV

2.3.2.1 Experimento 1. Efecto combinado de reguladores de crecimiento, antibióticos y antioxidantes en la regeneración de plantas libres del TSWV

A los 30 días de cultivo, los segmentos nodales cultivados en el medio compuesto por antioxidantes (ácido ascórbico y ácido cítrico), reguladores del crecimiento (AG₃ y AIA) y antibióticos (Cft y Amp) (MS-AAR) formaron el mayor número de brotes por explante (1.8), que los cultivados en los medios con antioxidantes y reguladores (MS-AOX1), o solo antioxidantes (MS-AOX). El porcentaje de explantes que formaron brotes osciló

entre 60 y 90 %, sin que hubiera diferencia significativa entre los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la combinación de antioxidantes, antibióticos y reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas de *Chrysanthemum moriflorun* libres de virus.

Medio de cultivo	Número de brotes por explante	Explantos que formaron brotes (%)	Plantas libres de tswv (%)
MS-EST	1.8 a	90.0a	88.0
MS-AOX1	0.9 b	90.0 a	55.0
MS-AOX	0.6 b	60.0 a	55.0

MS: sales basales de Murashige y Skoog al 50 %. MS-AAR: MS + antibióticos + antioxidantes + reguladores; MS-AOX1: MS + reguladores + antioxidantes; MS-AOX: MS + antioxidantes. Medias con la misma letra en una columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

El uso de Amp y Cft no solo ha permitido controlar la contaminación bacteriana en el cultivo de tejidos, sino que ha logrado promover la regeneración de plantas en especies como *Solanum lycopersicum* L (Gerszberg y Grzegorzcyk-Karolak, 2019), *Cucumis melo* L. var. Gorgab (Naderi *et al.* 2016) y *Ruellia tuberosa* (Lakshmi *et al.* 2021), además de inducir la embriogénesis somática en *Brassica napus* (Mineykina *et al.*, 2020). El efecto promotor de estos antibióticos se ha atribuido a que tienen estructura análoga a las auxinas, lo que podría generar un efecto similar (Meng *et al.*, 2014). Asimismo, la Cft y Amp tienen un grado de toxicidad bajo en las células vegetales, dado que su actividad está dirigida a la pared celular bacteriana (Petri, 2011).

Con respecto al porcentaje de plantas libres de TSWV, los coeficientes v de Cramer y de contingencia (0.33 y 0.31) (Cuadro 3), indicaron que existe una asociación moderada entre el efecto de los tratamientos (MS-AAR, MS-AOX, MS-AOX1) sobre la presencia del TSWV en las plantas. Mayor porcentaje de las plantas regeneradas (88.0) en el medio MS-AAR (reguladores, antioxidantes y antibióticos) estaban libres del TSWV, en relación a las que se obtuvieron en los medios MS-AOX1 (antioxidantes y reguladores) y MSAOX (Cuadro 2; Figuras 3A y 3B).

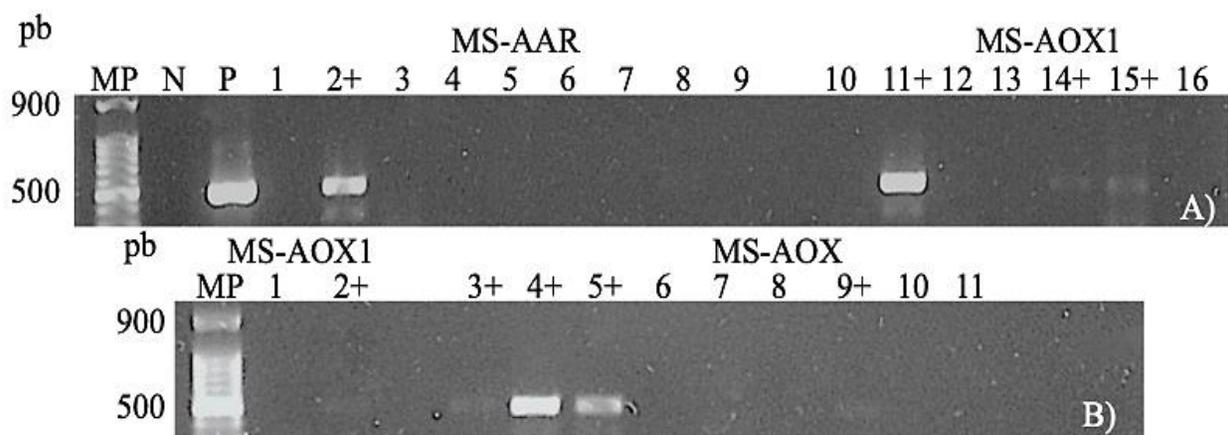


Figura 3. Primer experimento. A) Plantas regeneradas en el medio MS-AAR (reguladores, antibióticos y antioxidantes), carriles 1 al 9; plantas regeneradas en el medio MS-AOX1 (reguladores y antioxidantes), carriles 10 al 16. B) Plantas regeneradas en el medio MS-AOX1, carriles 1 y 2; plantas regeneradas en el medio MS-AOX (antioxidantes), carriles del 3 al 11. P: Testigo positivo (501 pb); N: testigo negativo; MP: marcador de peso molecular (100-1000 pb).

Cuadro 3. Prueba Chi-cuadrada y coeficientes de asociación. Experimento 1.

X^2	p-value	V de cramer	Coefficiente contingencia
3	0.223	0.33	0.31

V cramaer y coeficiente de contingencia: valores entre cero y uno, entre mas cercano a 1 significa altamente idependiente, cercanos a 0 hay independencia.

Basit *et al.* (2021) señalan que los antioxidantes como el ácido cítrico aumentaron la expresión del gen de resistencia NPR1 contra el TMV, en plantas de tabaco. NPR1 induce la activación de genes relacionados con la patogénesis (PR) (Fu *et al.*, 2012). Similarmente, el ácido ascórbico se ha reportado como un inhibidor de los supresores del silenciamiento génico de TuMV en plantas de *Brassica rapa* L (Fujiwara *et al.*, 2013). Por otra parte, la aplicación exógena de ácido giberélico (AG₃) ha podido revertir los síntomas de enanismo causados por el *Rice dwarf virus* (RDV) en *Oryza sativa* L (Zhu *et al.*, 2005). En tanto que, la interrupción de la señalización de auxinas como el AIA, por parte del virus, es crucial para la replicación y movimiento sistémico del virus (Collum *et al.*, 2016).

2.3.2.2 Experimento 2. Efecto independiente de antioxidantes, reguladores de crecimiento y antibióticos en la regeneración de plantas libres del TSWV

Después de 30 días de cultivo, los nudos cultivados en los medios con antioxidantes, antibióticos y reguladores (MS-AAR) o solo con antibióticos (MS-ANT), o con reguladores del crecimiento (MS-REG), indujeron el mayor número de brotes por explante (0.4-0.7) (Figura 4; Cuadro 4). Con relación al porcentaje de explantes que formaron brotes, no hubo diferencias significativas en los medios MS-AAR, MS-REG y MS-ANT, siendo en MS-AOX y MS-50, en los que se registraron los valores más bajos (Cuadro 4). Debido al bajo número de brotes por explante que se obtuvo en MS-50 (sales nutritivas) y MS-AOX (antioxidantes), no fue posible determinar el número de plantas libres de virus.

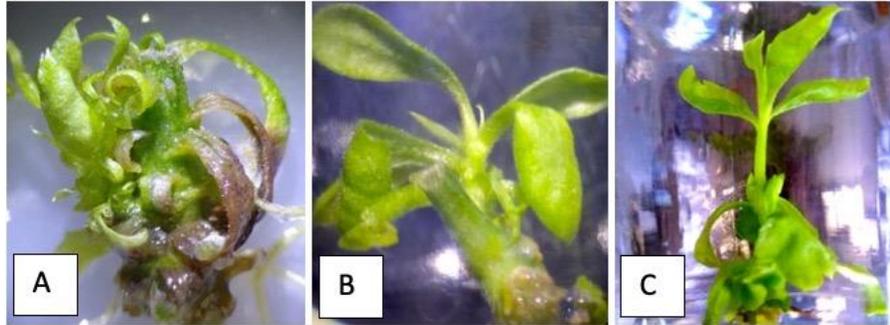


Figura 4. Plantas regeneradas a partir de explantes nodales de *C. morifolium*. A) Brotes formados en el medio MS-REG (AG₃ y AIA), después de 14 días de cultivo. B) Brote generado en un medio MS-EST (antioxidantes, reguladores, antibióticos). C) Brote en un medio MS-ANT (antibióticos).

Cuadro 4. Efecto independiente de antioxidantes, antibióticos y reguladores en la regeneración de plantas de crisantemo var. Harman libres de virus (Experimento 2).

Medio de cultivo	Número de brotes por explante	Explantes que formaron brotes (%)	Plantas libres de virus (%)
MS-AAR	0.75 a	65.0 a	100.0
MS-REG	0.40 ab	35.0 ab	40.0
MS-ANT	0.70 a	55.0 a	100.0
MS-AOX	0.15 b	15.0 b	ND
MS-50	0.20 b	20.0 b	ND

MS: sales basales de Murashige y Skoog al 50 %. MS-AAR: MS + antibióticos + antioxidantes + reguladores; MS-REG: MS + reguladores; MS-ANT: MS + antibióticos; MS-AOX: MS + antioxidantes; MS-50: MS. ND: no determinado. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cultivar los segmentos nodales en los medios con antibióticos, reguladores y antioxidantes (MS-AAR), o solo con antibióticos (MS-ANT) permitió que 100 % de las plantas regeneradas fueran libres del TSWV (Cuadro 4; Figuras 5A y 5C). En contraste, en 60 % de las plantas obtenidas en MS-REG (reguladores) fue posible observar la banda correspondiente al gen N de la proteína de la cápside del TSWV (Figura 5B). El coeficiente v de cramer (0.70) y el coeficiente de contingencia (0.57) indicaron que los medios MS-EST y MS-ANT, tienen un efecto (asociación) fuerte sobre la presencia del virus en las plantas regeneradas (Cuadro 5).

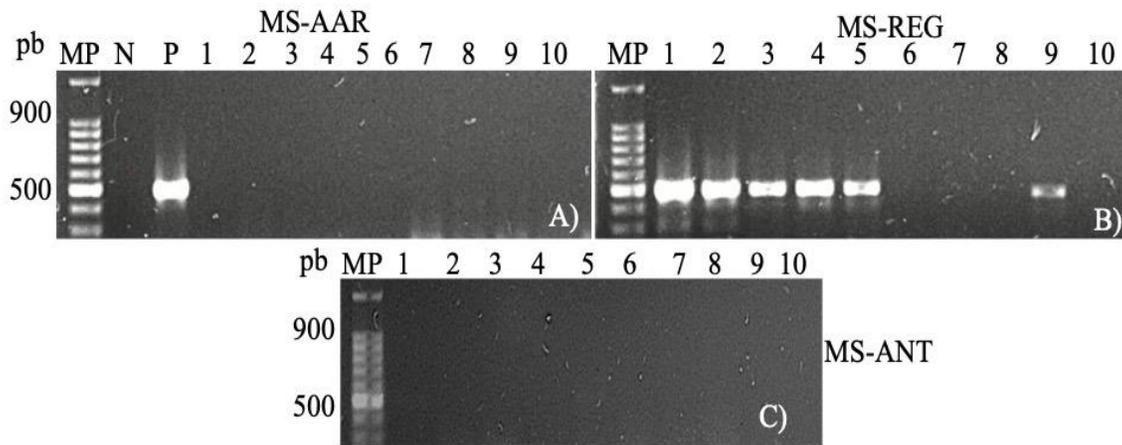


Figura 5. Experimento 2. A) Plantas regeneradas en el medio MS-AAR (reguladores, antibióticos, antioxidantes), carriles 1 al 10. B) Plantas obtenidas en el medio MS-REG (reguladores) carriles 1 al 10. C) Plantas generadas en el medio MS-ANT (antibióticos), carriles 1 al 10. MP: marcador de peso molecular; N: testigo negativo; P: testigo positivo.

Cuadro 5. Prueba Chi-cuadrada y coeficientes de asociación. Experimento 2.

X^2	p-value	V de cramer	Coficiente contingencia
15	0.0005	0.707	0.577

Coficientes V de cramer y de contingencia: valores entre cero y uno, entre mas cercano a 1 significa altamente idenpendiente, cercanos a 0 hay independencia.

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran la eficiencia que tienen los antibióticos Cft y Amp en la inducción de brotes en crisantemo. Panathula *et al.* (2014) observaron que la Cft por si sola promovió la formación de brotes en *Centella asiatica*. Asimismo, Danilova *et al.* (2004) y Yu *et al.* (2008) encontraron que la Cft indujo la regeneración de brotes en plantas de maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum aestivum*). Por su parte, la Amp estimuló la formación de brotes en *Brassica rapa* (Meng *et al.*, 2014).

No se conocen reportes que atribuyan un efecto antiviral a la Cft o a la Amp; sin embargo, se ha observado que la Cft genera hipermetilación del DNA en plantas de tabaco cultivadas *in vitro* (Schmitt *et al.*, 1997). Al igual que la Cft, la kanamicina puede alterar los estados de metilación en callos de *Arabidopsis thaliana* (Bardini *et al.*, 2003). La hipermetilación del DNA esta correlacionado con los procesos de silenciamiento génico, el cual, es un mecanismo de defensa por parte de las plantas contra las infecciones virales (Boyko *et al.*, 2007). De la misma manera, en *Arabidopsis* se encontró que la metilación del RNA genómico del *Alfalfa mosaic virus* (AMV) juega un papel fundamental en el ciclo de replicación viral, y que afecta el proceso de infección (Martínez-Pérez *et al.*, 2017). Raja *et al.* (2008) concluyeron que el DNA viral que se encontró en los tejidos recuperados de la infección de *Beet Curly Top Virus* (BCTV), estaba hipermetilado.

Los resultados de la presente investigación, sugieren que la cefotaxima y la ampicilina alteraron el estado de metilación tanto de la planta de crisantemo como del TSWV, promoviendo el silenciamiento de algunos de los genes del virus, necesarios para su replicación en las nuevas células regeneradas o bien activando otros genes involucrados en los mecanismos de defensa de la planta.

La generación de plantas libres de virus en crisantemo ha sido una tarea difícil (Ram *et al.*, 2009). La mayor parte de las técnicas utilizadas, se han enfocado al cultivo de meristemas, la termoterapia, quimioterapia o una combinación entre éstas. Sin embargo, el cultivo de meristemas se considera un proceso complejo y laborioso, que consume tiempo y mano de obra (Ram *et al.*, 2004; Ram *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009), siendo necesario encontrar alternativas a dicha práctica.

En la presente investigación se regeneraron plantas de *Chrysanthemum moriflorum* var. Harman libres del *Tomato spotted wilt virus*, mediante el cultivo de explantes distintos a los meristemas, los segmentos nodales, los cuales son, por mucho, más fáciles de obtener y cultivar. Asimismo, la supervivencia, velocidad de respuesta y la cantidad de plantas que se pueden obtener a partir de ellos, es mayor que la de los meristemas. El cultivo de los explantes nodales en medios con Cft y Amp, de manera independiente o combinada con reguladores de crecimiento (AIA, AG₃) y antioxidantes, permitió inhibir la replicación del virus TSWV en las plantas regeneradas.

1.6. CONCLUSIONES

Es posible obtener plantas de *C. moriflorum* var. Harman libres del *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV), al cultivar segmentos nodales en presencia de antibióticos o una combinación de éstos con reguladores de crecimiento y antioxidantes. El protocolo desarrollado aquí representa una alternativa viable para la producción de plantas de crisantemo libres del TSWV.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Ángel Martínez Infante durante sus estudios de Maestría (11933057). Al Laboratorio de Virología del Centro de Referencia Fitosanitaria del SENASICA por proporcionar cDNA plasmídico del TSWV (control positivo).

CAPITULO II. COMPARACIÓN DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT) Y UN SISTEMA CON MEDIO SEMISÓLIDO EN LA MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS DE *Chrysanthemum morifolium* L. LIBRES DE VIRUS

2.1. RESUMEN

Las enfermedades virales causan graves daños en el cultivo de crisantemo debido a que reducen la calidad de las flores, ocasionando grandes pérdidas económicas. Las técnicas del cultivo *in vitro* para la producción masiva de plantas libres de virus, es una alternativa eficiente. El objetivo fue evaluar un sistema de propagación *in vitro* utilizando un sistema en medio semisólido y un sistema de inmersión temporal (BIT), en la multiplicación de plantas de *Chrysanthemum morifolium* L. var. Harman, libres del Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). Plantas crisantemo, libres del virus TSWV, se cultivaron en un sistema de inmersión (BIT) y en un sistema de medio semisólido. Las condiciones de inmersión fueron de 1 min cada 8 hrs. Después de 30 días de cultivo, la respuesta de los explantes cultivados en el sistema BIT sin soporte de poliuretano fue inferior a la observada en aquellos que permanecieron en el sistema con medio semisólido. Incluir un soporte de poliuretano en el sistema BIT tuvo un efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento de los brotes regenerados, así como en el diámetro del tallo, el número de hojas y la supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación. Por otro lado, el soporte de poliuretano, disminuyó significativamente la hiperhidratación de los brotes generados y promovió su enraizamiento. El protocolo desarrollado es una alternativa viable y económica para la producción de plantas de crisantemo var. Harman libres del TSWV.

Palabras clave: *C. morifolium*, multiplicación, plantas libres de TSWV, sistemas de inmersión temporal, BIT.

COMPARISON OF A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM (BIT) AND A SEMI-SOLID MEDIUM SYSTEM IN THE MULTIPLICATION OF VIRUS-FREE *Chrysanthemum*

morifolium L. plants.

2.2. ABSTRACT

Viral diseases cause serious damage to the chrysanthemum crop because they reduce the quality of the flowers, causing great economic losses. *In vitro*, culture techniques for the mass production of virus-free plants are an efficient alternative. The objective was to evaluate an *in vitro* propagation system using a semi-solid medium system and a temporary immersion system (BIT), in the multiplication of plants of *Chrysanthemum morifolium* L. var. Harman, free of the Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). TSWV-free chrysanthemum plants were grown in an immersion system (BIT) and a semisolid medium system. Immersion conditions were 1 min every 8 hr. After 30 days of culture, the response of explants cultured in the BIT system without polyurethane support was lower than that observed in those that remained in the system with a semisolid medium. Including polyurethane support in the BIT, the system had a positive effect on the growth rate of regenerated shoots, as well as on stem diameter, number of leaves, and plant survival in the acclimatization stage. On the other hand, the polyurethane support significantly decreased the hyperhydration of the shoots generated and promoted their rooting. The protocol developed is a viable and economical alternative for the production of TSWV-free chrysanthemum var. Harman plants

Keywords: *C. morifolium*, multiplication, virus-free plants, TSWV, temporary immersion system, BIT.

2.3. INTRODUCCIÓN

Como el segundo cultivo florícola de mayor importancia económica a nivel mundial, el crisantemo es una planta ornamental que se ve afectada por un gran número de enfermedades virales (Teixeira *et al.*, 2013; Trolinger *et al.*, 2017) Dentro de los virus que afectan el cultivo de crisantemo se encuentran el *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Chrysanthemum virus B* (CVB), *Impatiens necrotic virus* (INSV), *Tomato aspermy virus* (TAV) y el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Budiarto 2011; Ram *et al.*, 2009; Kondo *et al.*, 2011); siendo el TSWV uno de los virus más importantes, por las pérdidas que ocasiona a este cultivo (Kohnić *et al.*, 2019; Renukadevi *et al.*, 2015). El crisantemo se propaga por esquejes o injertos, lo que favorece la transmisión de las enfermedades virales a partir de las plantas infectadas, además de ser un método costoso (Hahn *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2019).

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser exitosas en la erradicación de patógenos virales y en la propagación masiva de plantas libres de virus en cultivos como manzano (*Malus domestica*), papa (*Solanum tuberosum*) (Kim *et al.*, 2020; Andriani *et al.*, 2021), anturio (*Anthurium andreanum*), clavel (*Dianthus caryophyllus*) y crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* cv. “Chensu” y “Golden bel”) (Martínez-Estrada *et al.*, 2020; Ahmadian *et al.*, 2017; Hahn y Paek 2005; Hwang *et al.*, 2022). Los sistemas de propagación *in vitro* en medios semisólidos han sido los más utilizados (Quiala *et al.*, 2012); sin embargo, el tiempo y los costos de producción de estos sistemas, suelen ser elevados debido al costo del agente gelificante y a la mano de obra que se requiere para su mantenimiento; además de los problemas de contaminación debido a la manipulación continua de los explantes. Asimismo, el crecimiento y la multiplicación de las nuevas

plantas regeneradas se ven limitados por el espacio reducido de los recipientes utilizados (Maene y Debergh 1985; Gatti *et al.*, 2017). Ante esta problemática se ha optado por utilizar sistemas de inmersión temporal automatizados (SIT), debido a que pueden incrementar las tasas de multiplicación, reducir los costos y el tiempo de producción; además de disminuir las anomalías e hiperhidricidad de las plantas regeneradas (Kim *et al.*, 2020; Hahn y Paek. 2005; Albarran *et al.*, 2005).

Diferentes variantes de los SIT se han desarrollado, como el sistema RITA (Alvard *et al.*, 1993), el sistema SETIS (Hwang *et al.*, 2022), el sistema modular BioMINT (Robert *et al.*, 2006) y el sistema de vasos gemelos BIT (Escalona *et al.*, 1999). Pero el más utilizado, por lo económico del sistema, es el sistema de inmersión BIT (Escalona, 1999; Escalona 2003, Vives *et al.*, 2017; Arano-Avalos *et al.*, 2020).

El BIT se compone de dos frascos de 900 ml, uno que contiene a los explantes y en otro el medio líquido. Ambos frascos se conectan por una manguera de silicona, que permite el traslado del medio de cultivo de un lado a otro. En la tapa de los frascos se encuentran los filtros de membrana, que garantizan la esterilidad del sistema cuando inicia el suministro de aire (Escalona *et al.*, 1999)

Se ha reportado que los BIT han aumentado la calidad y producción de brotes en estevia (*Stevia rebaudiana* B Morita II), malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott), anturio (*Anthurium andreun*) y gerbera (*Gerbera jasmonii*) además de incrementar la biomasa y el contenido de esteviol glucósidos en estevia (Vives *et al.*, 2017; Arano-Avalos *et al.*, 2020; Martínez-Estrada *et al.*, 2019; Mosqueda-Frómata *et al.*, 2017).

En crisantemo (variedades, Snow White, Neznakomka, Baltica White, Chensou y Golden bel) la multiplicación de plantas *in vitro* se ha llevado a cabo, principalmente, mediante sistemas que emplean medios semisólidos (Mani y Senthil, 2011; Samala *et al.*, 2017; Borodulina *et al.*, 2019; Imtiaz *et al.*, 2019), líquidos (Sivakumar *et al.*, 2005; Hahn y Paek, 2005) y con menor frecuencia, en sistemas de inmersión temporal (Ebb and Flow y SETIS) (Hahn y Paek 2005; Hwang *et al.*, 2022). Aun cuando para algunas variedades de crisantemo (Chensou y Golden bel) se han establecido protocolos de multiplicación tanto en medios semisólidos como sistemas de inmersión temporal, la respuesta a dichas condiciones está en función del genotipo, como lo han señalado distintos autores (Texeira *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2011; Valle-Sandoval *et al.*, 2008).

Por lo anterior, el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar un sistema de propagación *in vitro* utilizando medio semisólido y un sistema de inmersión temporal, en la multiplicación de plantas de *Chrysanthemum morifolium* L. variedad Harman, libres de virus.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Plantas de crisantemo (*C. morifolium* L. var. Harman) libres del *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) fueron regeneradas *in vitro* a partir de explantes nodales de un cm de longitud. Los explantes fueron cultivados en un medio nutritivo compuesto por las sales basales de Murashige y Skoog (MS, 1962) al 50 %, 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 0.5 mg L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA), 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 100 L⁻¹ de ácido cítrico, 250 mg L⁻¹ de cefotaxima, 250 mg L⁻¹ de ampicilina, 2 % de sacarosa y 2.3 g L⁻¹ de phytigel. Los cultivos fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 1

°C, 16 h de luz e intensidad lumínica de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas fueron subcultivadas cada cuatro semanas durante 6 meses.

La sanidad de las plantas fue verificada por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). RNA extraído de brotes regenerados se incubaron a 70 °C por 5 min, para el alineamiento con los primers TSWV-1 (5'-TTCAGAAGGCTTGATAGC-3') y TSWV-2 (5'-CAAGCAAGTTCTGCGAG-3'), que amplifican el segmento S de la proteína de la cápside. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA por retrotranscripción (RT-general) utilizando la enzima M-MLV (PROMEGA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez generado el cDNA a partir del RNA, se procedió a realizar la PCR de punto final con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización de 94 °C por 2 min, temperatura de alineamiento de 51 °C por 30 s, y la temperatura de elongación fue de 72 °C por 1 min; la elongación final fue a 72°C por 7 min, durante 35 ciclos. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador bajo luz ultravioleta, el tamaño del producto PCR esperado fue de 501 pb.

2.2.2 Multiplicación en un sistema con medio semisólido y uno de inmersión temporal

2.2.2.1 Sistema en medio semisólido.

A partir de las plantas regeneradas *in vitro*, se obtuvieron nudos 1 cm longitud con una yema (explante). Dichos nudos se colocaron en un medio de multiplicación que contenía las sales basales MS al 100 %, 0.5 mg L⁻¹ de 6-furfurilaminopurina (cinetina), 0.3 mg L⁻¹

de ácido indol-3-acético (AIA), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, y 2.7 g L⁻¹ de phytigel. El medio (30 mL) se vertió en frascos de 280 ml. Una repetición consistió en 1 frascos con seis explantes en cada frasco, teniendo un total de 15 repeticiones.

2.2.2.2 Sistema de inmersión temporal.

El medio de cultivo utilizado tenía la misma composición que para el sistema en medio semisólido, pero carecía de phytigel. El BIT consistió de dos recipientes de vidrio de 900 mL de capacidad, en uno de los recipientes se agregaron 300 mL de medio de cultivo, y en el otro se colocaron 30 explantes; ambos recipientes estaban conectados por una manguera de silicona (sistema). La frecuencia de inmersión fue cada 8 h durante 1 min. Un sistema correspondió a una repetición, y se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

2.2.2.3 Soporte de poliuretano en los sistemas de inmersión temporal

Debido al remanente de medio de cultivo que permanecía en los frascos del BIT después de cada ciclo de inmersión, se decidió emplear un soporte de poliuretano de 12 cm de diámetro por 1 cm de grosor, el cual se colocó dentro de los recipientes que contenían los explantes y permaneció durante los 30 días de cultivo. El medio y la cantidad del mismo en el sistema BIT, fue igual al descrito anteriormente. En este experimento se evaluó un sistema con soporte y otro sin soporte (testigo); cada tratamiento consistió en cinco repeticiones (sistema) con 30 explantes por sistema.

Después de 30 días de cultivo se evaluó el número de brotes por explante, el porcentaje de explantes que formaron brotes, número de hojas por brote, el número de brotes que

formaron raíces, diámetro del tallo y el porcentaje de brotes hiperhidratados y la longitud del brote con un vernier digital.

2.2.3 Aclimatación de plantas provenientes de los medios semisólidos y el BIT

Las plantas regeneradas en los medios semisólidos y en los BIT se colocaron en charolas de plástico. Se utilizaron 18 vitroplantas por repetición, con cuatro repeticiones por tratamiento. Las charolas se cubrieron con un domo de plástico transparente para mantener la humedad, y se mantuvieron en un invernadero. Las plantas se regaron con agua de la llave una vez cada tercer día, y se fertilizaron cada 7 días con un fertilizante comercial vigor (N:13%, P:30% y K6%), luego de cuatro semanas se evaluó el porcentaje de supervivencia.

2.2.4 Análisis estadístico

Los experimentos realizados se condujeron con un diseño experimental completamente al azar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (0.05) utilizando el paquete estadístico Rstudio.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Multiplicación en un sistema con medio semisólido y uno de inmersión temporal (BIT)

Los sistemas de inmersión temporal han demostrado ser eficientes en la producción de brotes de anturio (Martínez-Estrada *et al.*, 2019), clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Ahmadian *et al.*, 2017) y sauce (*Salix viminalis*) (Regueira *et al.*, 2018). En el presente estudio, el número de brotes por explante obtenido en el sistema BIT no fue

significativamente diferente del sistema en medio semisólido (Cuadro 6), después de 30 días de cultivo. No obstante, el porcentaje de explantes que formaron brotes (94.4) y el número de hojas por brote (9.13) fue significativamente más alto en el medio semisólido (Cuadro 6; Figura 6A). Por su parte, la longitud (2.86 cm) y el diámetro (1.5 cm) de los brotes regenerados en el sistema BIT fue significativamente mayor que en el medio semisólido (Cuadro 6; Figura 6B).

Cuadro 6. Efecto del sistema de cultivo en la multiplicación de brotes de *C. morifolium* var. Harman, después de 30 días de cultivo.

Sistema de cultivo	Número de brotes por explante	Explantes que formaron brotes (%)	Longitud del brote (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de hojas por brote
SEM	1.91 a	94.4 a	2.86 b	1.5 b	9.13 a
BIT	1.87 a	47.8 b	4.93 a	2.10 a	7.93 b

SEM: Medio de cultivo semisólido; BIT: Biorreactor de Inmersión temporal. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).



Figura 6. Plantas de crisantemo después 30 días de cultivo. **A)** Planta regenerada en un sistema con medio semisólido; **B)** Planta regenerada en BIT; **C)** Planta hiperhidratada obtenida en BIT.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Monja-Mio *et al.* (2021) en *Agave angustifolia*, quienes compararon un sistema de inmersión temporal (RITA) y un sistema de cultivo en medio semisólido durante la etapa de multiplicación. Estos autores no encontraron diferencias en la cantidad de brotes regenerados en ambos sistemas, pero el crecimiento y la calidad de los brotes fue mayor en los sistemas RITA. De forma similar, Welander *et al.* (2014), observaron diferencias en la tasa de multiplicación en *Digitalis lutea x purpurea* y *Rubus ideaus* cuando evaluaron un sistema de inmersión y un sistema con agar. De acuerdo a estos resultados, parece ser que para algunas especies, la tasa de multiplicación no se ve incrementada por el uso de los sistemas de inmersión temporal con respecto a los sistemas con medio semisólidos, pero si se mejora la calidad de los brotes (Acanda *et al.*, 2017; Monja-Mio *et al.*, 2021).

En este trabajo, solo la longitud y diámetro del tallo, de los brotes regenerados en el BIT, fue significativamente mayor que en los sistemas semisólidos. Esto concuerda con los resultados de Hwang *et al.* (2022) quienes encontraron que los brotes de crisantemo var. Golden Bel regenerados en un SETIS, tenían mayor longitud y grosor del tallo que aquellos obtenidos en los sistemas semisólidos.

Se sabe que el espacio y ventilación dentro de cualquier sistema de cultivo, juegan un papel fundamental en la regeneración y crecimiento de los brotes (Kim *et al.*, 2020). El reabastecimiento de aire combinado con el contacto intermitente de los explantes con el medio líquido en el BIT, permite mayor crecimiento de las plantas (Preil 2005; Quiala *et al.*, 2006). En contraste, en el medio semisólido, las hojas de los explantes no tienen contacto directo con el medio (Escalona *et al.*, 1999; 2003; Aragón *et al.*, 2014; Jesionek

et al., 2017), limitando la absorción de nutrientes a la zona basal del explante (Guan y De Klerk, 2000).

Por otra parte, Escalona *et al.* (2003) encontraron que en los sistemas de inmersión temporal hay seis veces más CO₂ que en los sistemas con medio semisólido. El aumento de CO₂ favorece el desarrollo de las hojas, incrementado su tamaño (Ziska *et al.*, 2008). Los SIT permiten reducir la concentración etileno y promueven el intercambio de O₂ estimulando el crecimiento de los brotes (Aragón *et al.*, 2014).

2.3.2 Efecto del sistema de cultivo en la hiperhidratación y aclimatación

Después de 30 días de cultivo, mayor número de los brotes obtenidos en el BIT presentó hiperhidratación que en el medio semisólido (Figura 7A). Los brotes hiperhidratados mostraban una apariencia vítrea e hidratada como se puede observar en la Figura 6C.

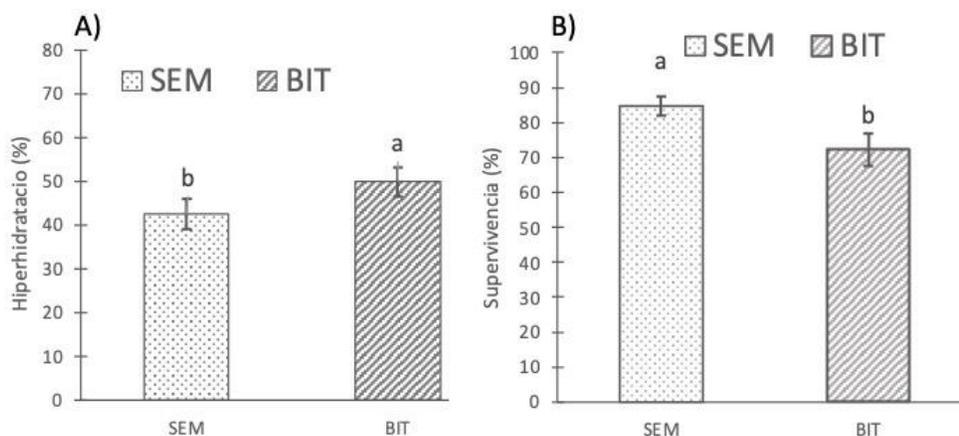


Figura 7. Efecto del sistema de cultivo en la hiperhidratación de los brotes (A) y la aclimatación (B) de las plantas de *C. morifolium* var. Harman. **SEM:** medio semisólido; **BIT:** sistema de inmersión temporal. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

La hiperhidratación es un desorden fisiológico provocado por las bajas concentraciones de oxígeno y potenciales hídricos más negativos en los medios de cultivo. Se ha

reportado que las hojas hiperhidratadas, muestran un desarrollo discontinuo de las células de la epidermis y la cutícula; además las células del mesófilo son poco diferenciadas y tienen menor número de cloroplastos (Chakrabarty *et al.*, 2006). Etienne y Berthouly (2002) mencionan que la hiperhidratación se debe a la acumulación de agua en el apoplasto, que incrementa el tamaño del espacio intercelular en las paredes vegetales, lo que genera el hinchamiento y/o apariencia vítrea de los tejidos. Asimismo, Kevers *et al.* (2004) señalan que los tejidos hiperhidratados presentan una menor cantidad de clorofila, lo que les confiere aspecto traslucido y menor capacidad fotosintética. Estos autores encontraron que las plantas hiperhidratadas no sobreviven a la etapa de aclimatación.

En crisantemo var. Chensou, Hahn y Paek (2005) observaron un potencial hídrico más alto (-3.76 MPa) en un sistema de cultivo líquido por inmersión que en el medio semisólido (2.4 Mpa). Como resultado, los explantes en el sistema de inmersión, inhibieron su crecimiento debido a la falta de oxígeno y poca actividad fotosintética.

En el sistema BIT evaluado en el presente trabajo, 50 % de los brotes regenerados mostraban hiperhidratación. Asimismo, fue posible observar que, al finalizar cada ciclo de inmersión, en los recipientes que contenían los explantes, quedaba un remanente de medio de cultivo, que ocasionaba que los brotes siempre estuvieran en contacto con éste. Lo anterior, posiblemente incrementó la humedad relativa del sistema, afectando el potencial hídrico y la cantidad de brotes hiperhidratados (Teisson y Alvard, 1995).

En cuanto a la supervivencia de las plantas regeneradas en condiciones de invernadero, aquellas obtenidas en el medio semisólido alcanzaron el mayor porcentaje de

supervivencia (84.72), con respecto a las obtenidas en el BIT (Figura 7B). Esto se debe posiblemente, al alto porcentaje de brotes hiperhidratados presentes en BIT. En contraste, las plantas de *Colocasia esculenta* L. Schott regeneradas en los sistemas BIT, SETIS y Ebb and Flog, mostraron porcentajes del 99 % supervivencia (Mancilla-Álvarez *et al.*, 2021).

2.3.3 Efecto del Soporte de poliuretano en los sistemas de inmersión temporal (BIT)

Con el fin de evitar el contacto continuo de los explantes con el medio de cultivo residual dentro del BIT, se decidió incluir un soporte de poliuretano en la base de este sobre el cual permanecieran los explantes.

Después de 30 días de cultivo, el porcentaje de brotes regenerados en el sistema BIT con soporte, que mostraban hiperhidratación, fue significativamente menor (10.3) que en el BIT sin soporte (56.7) (Figura 8A). Asimismo, los brotes regenerados en BIT sin el soporte presentaban oxidación en las hojas (Figura 9A).

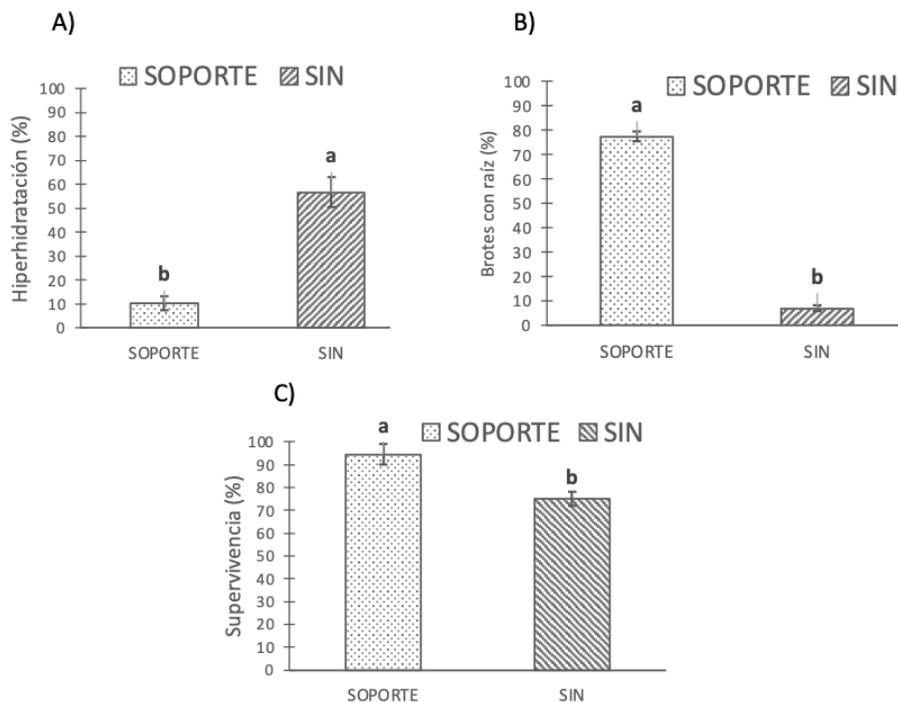


Figura 8. Efecto del soporte de poliuretano en la hiperhidratación (A), enraizamiento (B) y aclimatación (C) de los brotes *C. morifolium* L. Harman. SOPORTE: sistema BIT con soporte de poliuretano; SIN: sistema BIT sin soporte de poliuretano; Las barras representan la media + la desviación estándar. Letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).



Figura 9. Plantas de *C. morifolium* L. var. Harman regeneradas en un sistema BIT. **A)** Regeneradas en un sistema BIT sin soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **B)** Plantas con raíz, a partir de un sistema BIT con soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **C)** Brotes generados en un BIT con soporte; **D)** Plantas en un sistema BIT con soporte de poliuretano a los 30 días de cultivo; **E)** plantas regeneradas en un BIT con soporte (después de 7 en aclimatación).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el soporte de poliuretano, no solo redujo la hiperhidratación de los brotes regenerados, sino que incrementó significativamente el porcentaje de explantes que formaron brotes (77.3), el número de hojas en los brotes (8.36), la longitud de los brotes (4.62) (Cuadro 7) y el enraizamiento de estos (Figuras 8B y Figura 9B), con respecto a los obtenidos en el sistema BIT sin el soporte de poliuretano (Figura 8B y Figura 9A).

Cuadro 7. Efecto del soporte de poliuretano en el sistema BIT sobre la regeneración de brotes *C. morifolium* L. variedad Harman.

Soporte	Número de brotes por explante	Explantos que formaron brotes (%)	Longitud del brote	Diámetro del brote	Número de hojas por brote
Con	1.66 a	77.33 a	4.62 a	1.59 a	8.36 a
Sin	1.70 a	50.0 b	3.97 b	1.85 a	7.63 b

Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

Asimismo, las plantas regeneradas en el BIT con soporte alcanzaron el máximo porcentaje de supervivencia en condiciones de invernadero (94.0) (Figuras 8C y 10). Al respecto, Hwang *et al.* (2022) observaron que los brotes de crisantemo var. Golden Bel regenerados en un sistema SETIS, formaron raíces de mejor calidad que en un sistema semisólido.

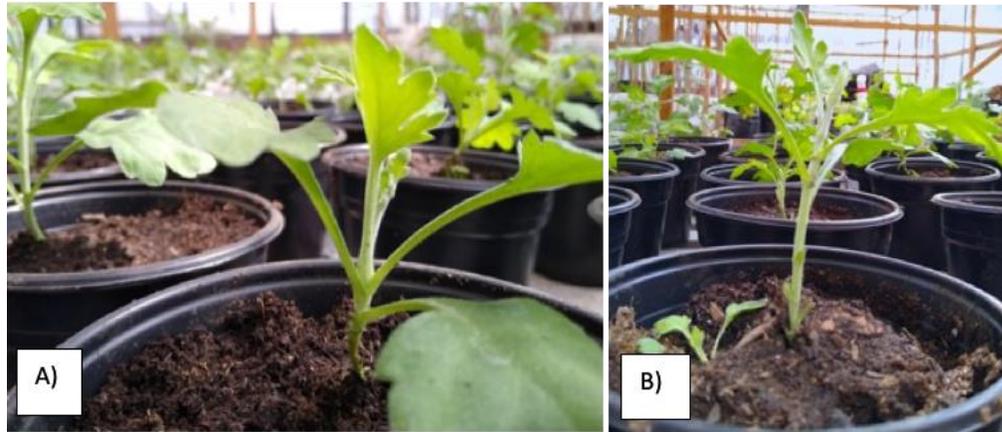


Figura 10. Plantas aclimatadas a los 45 días en aclimatación.

Distintos autores señalan que algunas de las características de las plantas regeneradas en los SIT que contribuyen a su supervivencia durante la fase de aclimatación, son el alto contenido de productos fotosintéticos en las hojas, un número más alto de estomas cerrados y el mayor vigor de las plantas (Estrada-Martínez *et al.*, 2019; Nicholson *et al.*, 2020).

En plantas de *Corylus avellana* X *Corylus americana* se observó que un mayor porcentaje de los brotes obtenidos en un sistema modular de inmersión temporal (Culture Shift; VRE System) con un soporte inerte (Oasis®), formaron raíces respecto a aquellos generados en medio semisólido (Nicholson *et al.*, 2020). Se ha reportado que los sustratos inertes han promovido el enraizamiento en *Carica papaya* L. de manera más eficiente que los medios semisólidos (Kaitiy *et al.*, 2009). Igualmente en *Grevillea thelemanniana* y *Verticordia plumosa* x *Chamelaucium uncinatum* la adición de arena blanca a los medios de cultivo promovió el enraizamiento y elongación de raíces (Newell *et al.*, 2003). De acuerdo con Adelberg (2017) algunos tipos de sustratos inertes Oasis® IVE, mejoran la disponibilidad de oxígeno y la respiración celular en raíces.

En el presente trabajo, fue posible observar que el uso del sistema BIT permitió que los brotes regenerados crecieran más rápidamente que los cultivados en medio semisólido; asimismo, el diámetro del tallo, el número de hojas de los brotes regenerados en el BIT y la supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación fue mayor. Por otro lado, el soporte de poliuretano dentro del sistema BIT, disminuyó la hiperhidratación de los brotes generados y promovió que en su mayoría formaran raíz, permitiendo con ello omitir la etapa de enraizamiento. Debido a que el agente gelificante de los medios semisólidos puede representar hasta 60 % de su costo, el sistema BIT con soporte de poliuretano, al no requerir de gelificante, es una opción más económica y eficiente para la producción masiva de plantas de *C. morifolium* var. Harman libres del *Tomato Spotted Wilt Virus*.

2.6. CONCLUSIONES

La respuesta de los explantes cultivados en el sistema BIT sin soporte de poliuretano fue inferior a la observada en aquellos que permanecieron en el sistema con medio semisólido. Las características de las plantas regeneradas en el sistema BIT, mejoraron significativamente cuando se incluyó un soporte de poliuretano. El protocolo desarrollado utilizando un sistema BIT con soporte, representa una opción viable, económica y reproducible para la propagación masiva de plantas de *Chrysanthemum morifolium* var. Harman libres de virus.

CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrolló un protocolo para la eliminación del TSWV de las plantas de *C. morifolium* L. "Harman", a partir del cultivo de segmentos nodales, utilizando medios de cultivo con antibióticos de manera individual o en combinación con antioxidantes y reguladores de crecimiento.

El sistema BIT con soporte de poliuretano permitió obtener plantas libres de virus de mayor calidad que las generadas en los BIT sin soporte y en el sistema con medio semisólido.

Este protocolo desarrollado es una alternativa viable y económica, para obtener plantas libres del TSWV y lograr su propagación a gran a escala.

LITERATURA CITADA

- Acanda Y., M. Canton, H. Wu and J. Zale (2017) Kanamycin selection in temporary immersion bioreactors allows visual selection of transgenic citrus shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 129:351-357.
- Adelberg J. (2017) Bioreactors and “smart vessels” for large-scale propagation. *Acta horticulturae*.1187:123-138.
- Aguilar M. E., K. Garita, Y. W. Kim, J. A. Kim and H. K. Moon (2019) Simple Protocol for the micropropagation of Teak (*Tectona grandis* Linn.) in Semi-Solid and Liquid Media in RITA® Bioreactors and ex Vitro Rooting. *American Journal of Plant Sciences*. 10:1121.
- Aka-Kaçar Y., B. Biçen, Ö. Z. Şimşek, H. A. N., Dönmez, D., & Erol, M. (2020). Evaluation and comparison of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for myrtle (*Myrtus communis* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*, 18:1611-1620.
- Al-Wakeel S. A. M., H. Moubasher, M. M. Gabr and M. M. Y. Madany (2013). Induced systemic resistance: an innovative control method to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) in tomato. *European Journal of Biology*. 72:9-21.
- Albarran J., B. Bertrand, M. Lartaud and H. Etienne (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81:27-36.
- Albouy J., J. C. Devergne and J. M. Mateo Box (2000) Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales (No. Sirsi) i9788471148889).
- Ali M. A., K. M. Nasiruddin, M. S. Haque and S. M. Faisal (2013) Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. *SAARC Journal of Agriculture*. 11:71-80.
- Alvarez-Díaz J. C., Ortiz-Echeverry, B. A. and Velásquez, N. (2019). Duplex RT-PCR assay for simultaneous detection of TSWV and CSVd in chrysanthemum. *Journal of virological methods*, 266, 41-48.
- Alvard D., F. Cote and C. Teisson (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 32: 55-60.
- Anderson N. O. (2007). *Dendranthema x grandiflora* Tzvelv. Flower Breeding and Genetics: Issues, *Challenges and Opportunities for the 21st Century*, 389.
- Aramburu de Vega, J. M., Galipienso Torregrosa, L., Soler, S., y López, C. (2007). La enfermedad del bronceado en tomate y pimiento: un problema permanente en una situación cambiante.

- Aljuaid B. S., A. O. Attia, I. A. Ismail, E. S. Dessoky, A. S. Sadik and M. E. Khalifa (2022) Production of virus-free rose plants using meristem-tip culture and in vitro thermotherapy. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 25:160-167.
- Asatani M. (1972). Freeing Chrysanthemums from the rod-shaped leaf mottling viruses and tomato aspermy virus by a combination of meristem-tip culture with heat-treatment. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universität*, 15:169-179.
- Ahmadian M., A. Babaei, S. Shokri and S. Hessami (2017) Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15:309-315.
- Andriani S., L. A. M. Siregar and I. Safni (2021) Microtubers production by using Temporary Immersion System (TIS) bioreactor to potato varieties. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 886:012005.
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29-38.
- Arano-Avalos, S., Gómez-Merino, F. C., Mancilla-Álvarez, E., Sánchez-Páez, R., & Bello-Bello, J. J. (2020). An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. *Scientia Horticulturae*, 261, 108998.
- Babiker, Y. F., Eltorkey, M. G., Elmokadem, H. E., El-Naggar, H. M., & Meheissen, M. A. M. (2021). Establishment of Callus Cultures of Chrysanthemum (*Dendranthemax grandiflorum*) var. 'Zembla yellow'. *Alexandria Journal of Agricultural Sciences*, 66(5), 123-132.
- Bello-Bello J. J., Cruz-Cruz, C. A., & Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (Musa AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 313-320.
- Bhojwani S. S., and P. K. Dantu (2013) Production of virus-free plants. *In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 227-243). *Springer*, India
- Borodulina I., A. Trufanova, G. Shevchenko, G. Sokolova and T. Plaksina (2019) Optimization of clonal micropropagation of Chrysanthemum. *Ukrainian Journal of Ecology*, 9:676-678.
- Bag S., N. Mitter, S. Eid and H. R. Pappu (2012) Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *Plos one*, 7:e44803-e44803. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044803>.

- Bardini M., M. Labra, M. Winfield and F. Sala (2003). Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72:157-162.
- Basit A., M. Farhan, W. D. Mo, H. X. Ding, M. Ikram, T. Farooq and M. El-Zohri (2021) Enhancement of resistance by poultry manure and plant hormones (salicylic acid & citric acid) against tobacco mosaic virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28:3526-3533.
- Barbosa C. J., J. A. Pina, J. Pérez-Panadés, L. Bernad, P. Serra, L. Navarro and N. Duran-Vila (2005). Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease*. 89: 749-754.
- Baulcombe D. C. and C. Dean (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6:a019471.
- Bausher MG (2013) Serial transmission of plant viruses by cutting implements during grafting. *Horticultural Science* 48:37–39.
- Benjamins R. and B Scheres (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review Plant Biology*. 59:443-465.
- Berthouly M. and H. Etienne (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, Dordrecht. pp. 165-195. DOI: https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11.
- Boase MR, Miller R, Delores SC (1997) Chrysanthemum systematics, genetics and breeding. En: Janick, J. (Ed) *Plant Breeding Reviews*. Vol.14. John Wiley and Sons, New York. 480 p.
- Bondok A. M., and M. F. M. Ibrahim (2014) Citric and Ascorbic Acid Drive some Physiological, Biochemical and Molecular Aspects in Tomato Plants Inoculated with *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *The Middle East Journal*. 3:1248-1261.
- Boonham N., J. Kreuze, S. Winter, R. van der Vlugt, J. Bergervoet, J. Tomlinson and R-Mumford (2014) Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus research*, 186, 20-31.
- Boyko A., P. Kathiria, F. J. Zemp, Y. Yao, I. Pogribny and I. Kovalchuk (2007) Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (Virus-induced plant genome instability). *Nucleic acids research*, 35:1714-1725.
- Brosseau C., and P. Moffett (2015) Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *The Plant Cell*. 27:1742-1754.

- Budiarto K. (2011). Elimination of *Cucumber mosaic virus* (CMV) From a Range of Chrysanthemum Cultivars Through Meristem Culture Following Heat Treatment. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 11:28-34.
- Chapman E. J., P. Hilson and T. L. German (2003) Association of L protein and *in vitro* *Tomato spotted wilt virus* RNA-Dependent RNA polymerase activity. *Intervirolgy*, 46:177-181.
- Cha-um S., N. T. Hien and C. Kirdmanee (2006) Disease-free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using *in vitro* meristem culture. *Biotechnology*, 5:443-448.
- Chakrabarty, D., Park, S. Y., Ali, M. B., Shin, K. S., & Paek, K. Y. (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology*. 26: 377-388.
- Chowdhury, J., Hoque, M. I., & Sarker, R. H. (2021). Development of an Efficient *In vitro* Regeneration Protocol for Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 31:161-171.
- Chung, B. N., Pak, H. S., Jung, J. A., & Kim, J. S. (2006). Occurrence of Tomato spotted wilt virus in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 22:230-234.
- Chen L., M. R. Wang, J. W. Li, C. H. Feng, Z. H. Cui, L. Zhao and Q. C. Wang (2019) Exogenous application of melatonin improves eradication of apple stem grooving virus from the infected *in vitro* shoots by shoot tip culture. *Plant Pathology*, 68:997-1006.
- Cieslińska, 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
- Colot, V., & Rossignol, J. L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 21:402-411.
- Coursey, T., Regedanz, E., & Bisaro, D. M. (2018). Arabidopsis RNA polymerase V mediates enhanced compaction and silencing of geminivirus and transposon chromatin during host recovery from infection. *Journal of Virology*, 92(7), e01320-17.
- Collum T. D., M. S. Padmanabhan, Y. C. Hsieh and J. N. Culver (2016) Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:2740-2749, <https://doi.org/10.1073/pnas.1524390113>.
- Cuperus, J. T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R. T., Takeda, A.,..... & Carrington, J. C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering

- RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nature structural & molecular biology*, 17:997-1003.
- Csorba T., A. Bovi, T. Dalmay and J. Burgyán (2007) The p122 subunit of *Tobacco Mosaic Virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA-and microRNA-mediated pathways. *Journal of virology* 81:11768-11780.
- Danilova S. A., and Y. I. Dolgikh (2004) The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51:559-562, <https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000035752.09295.55>.
- del Valle J. R. E., B. V. Toro, A. R. V. Fuentes and V. A. V. Velasco (2005) Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas in vitro durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28:377-383.
- De Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., Van Poelwijk, F., Peters, D., & Goldbach, R. (1991). *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72:2207-2216.
- Debergh P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman and M Ziv (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 30:135-140.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313:68-71.
- Eifan S., E. Schnettler, I. Dietrich, A. Kohl and A. Blomström (2013) Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses*, 5:2447-2468.
- El-Attar, A. K., EL-Shazly, M. A., Y Mokbel, S. A. (2017). Characterization of a novel asymptomatic isolate of Tomato spotted wilt virus, Infects chrysanthemum plants in Egypt. *Journal of Virological Sciences*, 2:17-31.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18:743-748.
- Escalona M., G. Samson, C. Borroto and Y. Desjardins (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39: 651-656.
- Escalona, M., Aragon, C. A., Capote, I., Pina, D., Cejas, I., Rodríguez, R., & González-Olmedo, J. (2007). Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta horticulturae*, 748:95-102
- Esquivel-Pool Á. G., E. Villanueva-Couoh, A. Pérez-Gutiérrez, L. A. Sánchez-Cach and C. F. J. Fuentes-Cerda (2005) El daminozide aumenta el diámetro de

- inflorescencia del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), cultivar polaris white. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11:361-364.
- Esteve-Puig, R., Bueno-Costa, A., & Esteller, M. (2020). Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer. *Cancer letters*, 474:127-137.
- Etienne H. and M. Berthouly (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:215-231.
- Faccioli G. (2001). Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. *In: Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Springer, Dordrecht. pp: 365-390.
- Foster T. M., T. J. Lough, S. J. Emerson, R. H. Lee, J. L. Bowman, R. L. Forster & W. J. Lucas (2002) A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *The Plant Cell*, 14:1497-1508.
- Fujiwara A., H. Shimura, C. Masuta, S. Sano and T. Inukai (2013) Exogenous ascorbic acid derivatives and dehydroascorbic acid are effective antiviral agents against *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa*. *Journal of General Plant Pathology*, 79:198-204.
- Fujiwara A., S. Togawa, T. Hikawa, H. Matsuura, C. Masuta and T. Inukai (2016) Ascorbic acid accumulates as a defense response to *Turnip mosaic virus* in resistant *Brassica rapa* cultivars. *Journal of experimental botany*. 67:4391-4402.
- Fu Z. Q., S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, ... and X. Dong (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. 486:228-232, <https://doi.org/10.1038/nature11162>.
- Gautam K. K., C. Kaur, R. Raj, S. Kumar, M. Jaidi, S. K. Raj & R. K. Roy (2017) Elimination of *Cucumber mosaic virus* from gerbera (*Gerbera jamesonii*) cv. Zingaro through *in vitro* chemotherapy of capitulum explants. *Indian Journal of Biotechnology*, 16:641-647.
- García J. A. y V. Pallás (2015) Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current opinion in virology*, 11: 21-30.
- García S., A. Billecocq, J. M. Crance, M. Prins, D. Garin & M. Bouloy (2006) Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *Journal of general virology*, 87:1985-1989.
- Gatti E., E. Sgarbi, E. A. Ozudogru and M. Lambardi (2017) The effect of PlantformTM bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151:1129-1136.

- Gaytán-Acuña, E. A., Ochoa-Martínez, D. L., García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E., & Mora-Aguilera, G. (2006). Producción y calidad comercial de flor de crisantemo. *Terra Latinoamericana*, 24: 541-548.
- Georgiev, V., A. Schumann, A. Pavlov and T. Bley (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621.
- Gerszberg, A., & Grzegorzczak-Karolak, I. (2019). Influence of selected antibiotics on the tomato regeneration in *in vitro* cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 558-564.
- Gil C. S., H. Y. Jung, C. Lee and S. H. Eom (2020) Blue light and NAA treatment significantly improve rooting on single leaf-bud cutting of Chrysanthemum via upregulated rooting-related genes. *Scientia Horticulturae*, 274, 109650.
- Gravel V., H. Antoun and R. J. Tweddell (2007) Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, 119(4), 457-462.
- Gómez, D., Hernández, L., Valle, B., Martínez, J., Cid, M., Escalona, M., & Lorenzo, J. C. (2017). Temporary immersion bioreactors (TIB) provide a versatile, cost-effective and reproducible *in vitro* analysis of the response of pineapple shoots to salinity and drought. *Acta physiologiae plantarum*, 39(12), 1-8.
- Gupta, R., Gupta, A., Jain, S., Singh, D., & Verma, N. (2021). Chrysanthemum Production, Viral Diseases and Their Management. *In Virus Diseases of Ornamental Plants* (pp. 261-275). Springer, Singapore.
- GUȚĂ, I. C., BUCIUMEANU, E. C., and E. VIȘOIU (2014). Elimination of *Grapevine fleck virus* by *in vitro* Chemotherapy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42:115-118.
- Guan H., and G. J. De Klerk (2000) Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface. *Scientia horticulturae*. 86:23-32.
- Hakkaart F. A. and F. Quak (1963) Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemums from virus B by means of meristem culture. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 70:154-157.
- Harberer G. and J. J. Kieber (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128:354-362.
- Hahn, E. J., Bae, J. H., & Lee, Y. B. (1998). Growth and leaf-surface characteristics of *Chrysanthemum* plantlets between micropropagation and microponic system. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* (Korea Republic). 39:838-842.

- Hahn E. J. and K. Y. Paek (2005) Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant cell, tissue and organ culture*, 81(3), 301-306.
- Hansen, A. J., & Lane, W. D. (1985). Elimination of *Apple chlorotic leafspot virus* from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease*, 69(2), 134-135.
- He L., H. Li, A. Wu, Y. Peng, G. Shu and G. Yin (2019) Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Molecular cancer*, 18(1), 1-15.
- Heinze C., B. Letschert, D. Hristova, M. Yankulova, O. Kauadjouor, P. Willingmann and G. Adam (2001) Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). *The New microbiologica*, 24(2), 175-187.
- Hesami, M., Naderi, R., Tohidfar, M., Y Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2020). Development of support vector machine-based model and comparative analysis with artificial neural network for modeling the plant tissue culture procedures: effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis of chrysanthemum, as a case study. *Plant Methods*, 16(1), 1-15.
- Hollings, M., & Stone, O. M. (1970). Attempts to eliminate chrysanthemum stunt from chrysanthemum by meristem-tip culture after heat-treatment. *Annals of Applied Biology*, 65(2), 311-315.
- Horst RK. 1990. Chrysanthemum. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj YPS, editors. Handbook of plant cell culture-ornamental species. New York: McGraw-Hill Publishing Co. 5. pp 319 – 336.
- Horst R. K. and P. E. Nelson (1997) Compendium of chrysanthemum diseases. APS Press. pp. 88.
- Hussein H. A. A., M. N. Sharaf El-Din, M. M. Kasem and E. A. Lotfy (2017) Influence of Some Plant Growth Substances on Shoot and Root Initiations of Chrysanthemum Explants in Vitro. *Journal of Plant Production*, 8:71-76.
- Hu Z. Z., Z. K. Feng, Z. J. Zhang, Y. B. Liu and X. R. Tao (2011) Complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. *Archives of virology*, 156:1905-1908.
- 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.
- Hu G. J., Z. P. Zhang, Y. F. Dong, X. D. Fan, F. Ren, and H. J. Zhu (2015) Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australasian Plant Pathology*. 44:167–173.

- Hu G. J., N. Hong and G. P. Wang (2019) Elimination of *Apple stem pitting virus* from in vitro-cultured pear by an antiviral agent combined with thermotherapy. *Australasian Plant Pathology*. 48:115-118.
- Hwang H. D., S. H. Kwon, H. N. Murthy, S. W. Yun, S. S. Pyo, and S. Y. Park (2022). Temporary Immersion Bioreactor System as an Efficient Method for Mass Production of *In Vitro* Plants in Horticulture and Medicinal Plants. *Agronomy*. 12: 346.
- Imtiaz M., A. M. Khattak, M. A. Khan, F. Jalal, S. Hussain, F. Said and H. Bo (2019) Rapid *in-vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants. *Pakistan Journal of Botany*. 51:1093-1098.
- 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 the Romanian Society for Cell Biology*, 17:101-110.
- Jeon S. M., W. D. Savitri, K. I. Park, M. Y. Chung and C. K. Kim (2012) Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from an Viroid infected Chrysanthemum through Shoot Tip Culture. *Flower Research Journal* 20:218-222.
- Jesionek A., A. Kokotkiewicz, P. Wlodarska, B. Zabiegala, A. Bucinski and M. Luczkiewicz (2017) Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 131:51-64.
- Kaur C., R. Raj, S. Kumar, D. K. Purshottam, L. Agrawal, P. S. Chauhan and S. K. Raj (2019) Elimination of Bean yellow mosaic virus from infected cormels of three cultivars of gladiolus using thermo-, electro-and chemotherapy. 3 *Biotech*, 9:1-10.
- Kaul V., R. M. Miller, J. F. Hutchinson and D. Richards (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:21-30.
- Kaity A., Parisi, A. M., Ashmore, S. E., & Drew, R. A. (2009). Root initiation and acclimatization of papaya plants. In III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812 (pp. 387-394).
- Kevers C., T. Franck, R. J. Strasser, J. Dommès and T. Gaspar (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77:181-191.
- Kazeroonian, R., Mousavi, A., Jari, S. K., & Tohidfar, M. (2018). Factors Influencing *in Vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid'. *Iranian journal of biotechnology*, 16(2), e1454. <https://doi.org/10.21859/ijb.1454>.

- Khan A., and M. Ashraf (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and experimental botany*, 63(1-3), 224-231.
- Khurana S. M. P. (2004) Potato viruses and their management. *In: Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 389-440). Springer, Dordrecht.
- Kim S. J., E. J. Hahn, K. Y. Paek and H. N. Murthy (2003) Application of bioreactor culture for large scale production of *Chrysanthemum* transplants. *Acta horticulturae*. 187-191.
- Kim M. Y., J. A. Chun, K. H. Cho, S. J. Park, S. H. Kim and H.C. Lee (2017) Efficiency of virus elimination in apple calli (cv. Hongro) derived from meristem culture of dormant buds. *Journal of Plant Biotechnology*, 44(4), 379-387.
- Kim N. Y., Hwang, H. D., Kim, J. H., Kwon, B. M., Kim, D., & Park, S. Y. (2020). Efficient production of virus-free apple plantlets using the temporary immersion bioreactor system. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 61(4), 779-785.
- Klein R. E. and C. H. Livingston (1983) Eradication of *Potato viruses X* and *S* from potato shoot-tip cultures with ribavirin [*Solanum tuberosum*]. *Phytopathology*, 73(7), 1049-1050.
- Kohnić A., M. Radulović, and D. Delić (2019) First report of *Tomato spotted wilt virus* on chrysanthemum in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology*, 101(2), 421-421.
- Kondo T., K. Yamashita and S. Sugiyama (2011) First report of *Impatiens necrotic spot virus* infecting chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) in Japan. *Journal of general plant pathology*, 77:263-265.
- Kormelink R., P. De Haan, C. Meurs, D. Peters and R. Goldbach (1992) The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, 73(11), 2795-2804.
- Kormelink, R., Storms, M., Van Lent, J., Peters, D., & Goldbach, R. (1994). Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 200(1), 56-65.
- Krczal G. (1998) Virus certification of ornamental plants—the European strategy. *Plant Virus Disease Control. American Phytopathological Society Press*, 277-287.
- Križnik M., M. Petek, D. Dobnik, Ž. Ramšak, Š. Baebler, S. Pollmann and K. Gruden (2017) Salicylic acid perturbs sRNA-gibberellin regulatory network in immune response of *Potato to potato virus Y* infection. *Frontiers in plant science*. 8: 2192.
- Kumar S., M. S. Khan, S. K. Raj and A. K. Sharma (2009) Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy virus* from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 108-112.

- Kumar S. 2009. Molecular characterization of Cucumoviruses causing mosaic and ring spot diseases in chrysanthemums and development of their effective management strategies. Thesis. University of Lucknow, India.
- Křížan B., E. Ondrušiková, V. Holleínova, K. Moravcova and L. Blahova (2009) Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by *in vivo* and *in vitro* thermotherapy. *Horticultural Science*, 36(3), 105-108.
- Lacomme C. (2015). Strategies for Altering Plant Traits Using Virus-Induced Gene Silencing Technologies. In: Mysore K., Senthil-Kumar M. (eds) Plant Gene Silencing. *Methods in Molecular Biology*, vol 1287. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_2
- Lakshmi P. C., C. N. Reddy and B. Srinivas (2021) Effects of Bavistin and Cefotaxime on *in vitro* Contaminant free Shoot Regeneration of *Ruellia tuberosa* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 31: 1-12
- Law M. D. and J. W. Moyer (1990) A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*. 71:933-938
- Lewandowski D. J., and S. Adkins (2005) The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. *Virology*, 342(1), 26-37.
- Li T., Y. Huang, Z. S. Xu, F. Wang and A. S. Xiong (2019) Salicylic acid-induced differential resistance to the *Tomato yellow leaf curl virus* among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC plant biology*. 19:1-14.
- Lim K. B., S. J. Kwon, S. I. Lee, Y. J. Hwang and A. H. Naing (2012) Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of chrysanthemum. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 53:329-335.
- Lotfi M., C. Bayoudh, S. Werbrouck and M. Mars (2020) Effects of meta-topolin derivatives and temporary immersion on hyperhydricity and *in vitro* shoot proliferation in *Pyrus communis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143:499-505.
- Luppichini B. and M. Paola (2000) Termoterapia y cultivo de meristemas para la eliminacion del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) en un clon selecto de ajo (*Allium sativum* L.).
- Madugula S. and U. D. Gali (2017) Virus indexing for *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (SCYLV) in field varieties and *in vitro* regenerated plantlets of sugarcane. *Australasian Plant Pathology*. 46:433-439.
- Mancilla-Álvarez E., J. A. Pérez-Sato, R. Núñez-Pastrana, J. L. Spinoso-Castillo and J. J. Bello-Bello (2021) Comparison of different semi-automated bioreactors for *in vitro* propagation of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 10:1010.

- Maene L. and P. Debergh (1985) Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 5: 23-33.
- Mani T., and K. Senthil (2011) Multiplication of Chrysanthemum through somatic embryogenesis. *Asian Journal Pharma Technology*. 1:13-16.
- Margaria P., M. Ciuffo, D. Pacifico and M. Turina (2007) Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20:547-558.
- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J. A., & Bello-Bello, J. J. (2019). Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 249, 185-191.
- Martínez-Pérez M., F. Aparicio, M. P. López-Gresa, J. M. Bellés, J. A. Sánchez-Navarro and V. Pallás (2017) Arabidopsis m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m6A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114:10755-10760.
- Marys, E., Mejías, A., Rodríguez-Román, E., Avilán, D., Hurtado, T., Fernández, A., Y y Brito, M. (2014). The first report of Tomato spotted wilt virus on Gerbera and *Chrysanthemum* in Venezuela. *Plant disease*, 98(8), 1161-1161
- Matsuura, S., Ishikura, S., Shigemoto, N., Kajihara, S., & Hagiwara, K. (2004). Localization of *Tomato spotted wilt virus* in chrysanthemum stock plants and efficiency of viral transmission from infected stock plants to cuttings. *Journal of phytopathology*, 152:219-223. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00833.x>.
- Matsuura, S., Kubota, K., & Okuda, M. (2007). First report of *Chrysanthemum stem necrosis virus* on chrysanthemums in Japan. *Plant disease*, 91(4), 468-468.
- Meng Q., Z. Liu, Y Zhang, C. Liu, F. Ren and H. Feng (2014) Effects of antibiotics on in vitro-cultured cotyledons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50:436-441, <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9595-3>.
- Medzihradzky, A., Gyula, P., Sós-Hegedűs, A., Szittya, G., & Burgyán, J. (2019). Transcriptome reprogramming in the shoot apical meristem of CymRSV-infected *Nicotiana benthamiana* plants associates with viral exclusion and the lack of recovery. *Molecular Plant Pathology*, 20(12), 1748-1758.
- Mehedi, M. N. H., Mitu, N., Robbani, M., Sukhi, K. F. N., Rahman, M. H. S., & Noor, M. M. A. (2020). Impact of Different Explants and Growth Regulators on In vitro Regeneration of Chrysanthemum. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 4(4), 10-18. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2020/v4i430112>

- Min, H., Hu, S. B., Li, Z. N., Wu, Y. F., Zhang, C. P., & Wei, T. (2009). A phytoplasma associated with an outbreak of an unusual disease of chrysanthemum in China in 2008. *Plant Disease*, 93(8), 840-840.
- Mineykina, A., Shumilina, D., Bondareva, L., Soldatenko, A., & Domblides, E. (2020). Effect of beta-lactam antibiotics on microspore embryogenesis in Brassica species. *Plants*, 9(4), 489.
- Monja-Mio K. M., D. Olvera-Casanova, M. A. Herrera-Alamillo, F. L. Sánchez-Teyer and M. L. Robert (2021) Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora'. 3 *Biotech*. 11:1-8.
- Mori K. (1971). Production of virus-free plants by means of meristem culture. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 6:1-7.
- Mori K., and D. Hosokawa (1977) Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. In Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78 (pp. 389-396).
- Mosqueda-Frómata O., M. M. Escalona-Morgado, J. A. Teixeira da Silva, D. T. Pina-Morgado and M. A. Daquinta-Gradaille (2017) In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 129:543-551.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473–497.
- Naing, A. H., Kim, C. K., Yun, B. J., Jin, J. Y., & Lim, K. B. (2013). Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. Euro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 112:361-368.
- Nascimento L. C., G. Pio-Ribeiro, L. Willadino and G. P. Andrade (2003) Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola*. 60:525-530.
- Nesi B., D. Trinchello, S. Lazzereschi, A. Grassotti, and B. Ruffoni (2009) Production of lily symptomless virus-free plants by shoot meristem tip culture and *in vitro* thermotherapy. *American Society for Horticultural Science*. 44:217-219.
- Noda N., S. Yoshioka, S. Kishimoto, M. Nakayama, M. Douzono, Y. Tanaka and R. Aida (2017) Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Science advances*. 3:e1602785.
- Newell C., D. Growns and J. McComb (2003) The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75:131-142.

- Nicholson J., M. R. Shukla and P. K. Saxena (2020) *In vitro* rooting of hybrid hazelnuts (*Corylus avellanax Corylus americana*) in a temporary immersion system. *Botany*, 98:343-352.
- Naderi D., O. Askari-Khorasgani and E. Mahmoudi (2016) Cefotaxime and benzyladenine improve melon regeneration. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14:56–60. [https://doi: 10.15171/ijb.1077](https://doi:10.15171/ijb.1077).
- Ochoa-Martínez D. L., E. Zavaleta-Mejía, G. Mora-Aguilera and N. R. M. Johansen (1999) Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Pathology*, 48:707-717, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00397.x>.
- Osuna O. E. P., F. R. Betancur and H. R. Espinosa (2016) Dinámica del cultivo y mercado de flores en México, 1995-2012. *Revista Universidad Gran Colombia Ciencia*, 22:111-118.
- Paludan N. (1973). Virus-free chrysanthemum plants from approved cultivars obtained by means of heat treatment and meristem tip culture. *Tidsskrift for Planteavl*, 77: 689-696.
- Parmessur Y. and A. Saumtally (2002) Elimination of sugar cane yellow leaf virus and sugarcane bacilliform virus by tissue culture. In *Proceedings of the Fifth Annual Meeting of Agricultural Scientist* (pp. 127-133).
- Panathula C. S., M. D. N. Mahadev and C. V. Naidu (2014) The stimulatory effects of the antimicrobial agents bavistin, cefotaxime and kanamycin on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.)—an important antijaundice medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences*, 5:279-285, <https://DOI:10.4236/ajps.2014.53038>.
- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2011). Selective chemotherapy on Grapevine leafroll-associated virus-1 and-3. *Phytoparasitica*, 39(5), 503.
- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1), 173-188.
- Panattoni, A., Rinaldelli, E., Materazzi, A., & Luvisi, A. (2015). Modulation of viral infection in plants by exogenous guanosine. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(11), 1-6.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J. & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(3), 1291-1303.
- Picoli, E. A., Otoni, W. C., Figueira, M. L., Carolino, S. M., Almeida, R. S., Silva, E. A. & Fontes, E. P. (2001). Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, 160(5), 857-868.

- Pollock, K., Barfield, D. G., & Shields, R. (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant cell reports*, 2(1), 36-39.
- Pooja, A., Panwar, S., Tiwari, A. K., & Kumar, G. (2021). Standardization of *in vitro* regeneration protocol in annual chrysanthemum. *Indian Journal of Horticulture*, 78(1), 46-52.
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 1-18). Springer, Dordrecht.
- Petri W. A. (2011) Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics: *In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. L.L. Brunton, B. Chabner and B Knollman (eds)12th Ed McGraw-Hill. New York, USA. pp:1477-1504.
- Previati, A., Benelli, C., Da Re, F., Ozudogru, A., & Lambardi, M. (2008). Micropropagation and *in vitro* conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants*, 8(2), 93-98.
- Quiala, E., Barbón, R., Jimenez, E., De Feria, M., Chávez, M., Capote, A., & Pérez, N. (2006). Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3), 298-300.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Villedor, L., & Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109:223-234.
- Quiroz, K. A., Berríos, M., Carrasco, B., Retamales, J. B., Caligari, P. D., & García-González, R. (2017). Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biological Research*, 50.
- Raj, S. K., Kumar, S., & Choudhari, S. (2007). Identification of Tomato aspermy virus as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 2(1), 1-2.
- Raja P., B. C. Sanville, R. C. Buchmann and D. M. Bisaro (2008) Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *Journal of Virology*, 82:8997-9007, <https://doi.org/10.1128/JVI.00719-08>.
- Ramgareeb, S., Snyman, S. J., Van Antwerpen, T., & Rutherford, R. S. (2010). Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(2), 175-181.
- Ram, R., Verma, N., Singh, A. K., Singh, L., Hallan, V., y Zaidi, A. A. (2005). Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biologia Plantarum*, 49(1), 149-152.

- Ram, R., Verma, N., Singh, A. K., y Zaidi, A. A. (2009). Virus-free chrysanthemums: production and quality management. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(10), 940-949.
- Renukadevi, P., Nagendran, K., Nakkeeran, S., Karthikeyan, G., Jawaharlal, M., Alice, D., & Pappu, H. R. (2015). First report of Tomato spotted wilt virus infection of chrysanthemum in India. *Plant Disease*, 99:1190-1190.
- Regueira M., E. Rial, B. Blanco, B. Bogo, A. Aldrey, B. Correa and N. Vidal (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*. 32:61-71.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. Á., & Fuentes-Carrillo, P. (2006). A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. In *Plant cell culture protocols* (pp. 121-129). Humana Press.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Alamillo, M. A., Quijano, A., & Balám, U. (2004). Manual for the in vitro culture of Agaves. United Nations Industrial Development Organization.
- Rybicki, E. P. (2015). A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of virology*, 160:17-20.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). Productores mexicanos preparados para abastecer demanda de flores, comunicado de prensa SAGARPA, Num.105/15, pp:1-2.
- Saleh O I., O. I. Abd-El-Aziz, A. Nabila, M. Hassan-Hanaa and A. Nady-Yasmine (2021). Using of Some Antioxidants for Cotrolling of Mosaic Causing Viruses on Vegetables In Minia Governorate, Egypt. *Plant Biotechnology*. 59:189-196.
- Samala S., K. Kongton, K. Saisaard, B. Nupan, K. Thongyai and S. Taweerodjanakarn (2017) Effects of plant growth regulators on multiple shoots regeneration of in vitro *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Acta horticulturae*.1167:143-148.
- Satoh, K., Yoneyama, K., Kondoh, H., Shimizu, T., Sasaya, T., Choi, I. R., & Kikuchi, S. (2013). Relationship between gene responses and symptoms induced by Rice grassy stunt virus. *Frontiers in microbiology*. 4:313.
- Sangwan, R. S., Detrez, C., & Sangwan-Norreel, B. S. (1987). In vitro culture of shoot-tip meristems in some higher plants. In *Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants* 212 (pp. 661-666). DOI:10.17660/ActaHortic.1987.212.111
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., & Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology*, 138:1842-1852.

- Schmitt F., E. J. Oakeley and J. P. Jost (1997) Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Biological Chemistry*. 272:1534-1540.
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T. y Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 12:938-954.
- Senthilraja C., V. G. Malathi, S. Nakkeeran, M. Suganthy, U. Sivakumar and P. Renukadevi (2021) Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) infecting Chrysanthemum in India. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 43:641-650.
- Sepúlveda, P., Rosales, I. M., Rojas, C., Medina, C. V., Sepúlveda, G., Brown, J. K., y Mora, R. (2011). Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la región de Arica y Parinacota: situación actual y manejo. *Boletín Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. 224.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP (2020): Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Cierre de la producción agrícola por cultivo.
- Sharma, N., Sahu, P. P., Puranik, S., & Prasad, M. (2013). Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). *Molecular biotechnology*, 55(1), 63-77.
- Singh D., M. Pathania, R. Ram, A. A. Zaidi and N. Verma (2010) Screening of chrysanthemum cultivars for Chrysanthemum stunt viroid in an Indian s.
- Sivakumar, G., Kim, S. J., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2005). Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon-type bioreactor culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(6), 822-825.
- Sivaprasad, Y., Garrido, P., Mendez, K., Pachacama, S., Garrido, A., y Ramos, L. (2018). First report of tomato spotted wilt virus infecting Chrysanthemum in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*, 100(1), 113-113.
- Smith G. R., J. D. Fletcher, V. Marroni, J. M. Kean, L. D. Stringer and J. Vereijssen (2017) Plant pathogen eradication: determinants of successful programs. *Australasian Plant Pathology*, 46:277-284, <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0489-9>.
- Solano-Baez, R., Leyva-Mir, S. G., Tlapal-Bolaños, B., y Mariscal-Amaro, L. A. (2013). Etiología y respuesta de variedades de crisantemo a la pudrición del tallo en el Estado de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(1), 49-59.
- Song, J. Y., Mattson, N. S., & Jeong, B. R. (2011). Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(2), 295-304.

- Song, G., Wu, J. Y., Xie, Y., Liu, Y., Qian, Y. J., Zhou, X. P., & Wu, J. X. (2017). Monoclonal antibody-based serological assays for detection of Potato virus S in potato plants. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(12), 1075-1082.
- Spaargaren J., and van G. Geest (2018) *Journal: Handbook of Plant Breeding Ornamental Crops*, 2018, p. 319-348.
- Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D., y Krstić, B. (2013). First Report of *Tomato spotted wilt virus* on Chrysanthemum in Serbia. *Plant disease*, 97:150-151.
- Storms, M. M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J. W., y Goldbach, R. W. (1995). The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, 214(2), 485-493.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). Productores mexicanos preparados para abastecer demanda de flores, comunicado de prensa SAGARPA, Num.105/15, pp:1-2.
- Sharifi Nezamabad, P., Koochi Habibi, M., Dizadji, A., & Kalantari, S. (2015). Elimination of Bean yellow mosaic virus through thermotherapy combined with meristem-tip culture in gladiolus corms. *Journal of Crop Protection*, 4(4), 533-543.
- Shahzad, A., Parveen, S., Sharma, S., Shaheen, A., Saeed, T., Yadav, V., & Upadhyay, A. (2017). Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. In: *Plant Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 37-72). Springer, Singapore.
- Supakitthanakorn, S., Wichitrakoonthavorn, G., Kunasakdakul, K., & Ruangwong, O. U. (2021). First detection and characterization of chrysanthemum virus b infecting chrysanthemum in Thailand. *Research Square*; 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-271574/v1.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., ... & Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS letters*, 532:75-79.
- Tanaka, K., Kanno, Y., Kudo, S., & Suzuki, M. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Cell Reports*, 19:946-953.
- Teisson C., and D. Alvard (1995). A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. In *Current issues in plant molecular and cellular biology* (pp. 105-110). Springer, Dordrecht.
- Teixeira da Silva, J. A., Shinoyama, H., Aida, R., Matsushita, Y., Raj, S. K., & Chen, F. (2013). Chrysanthemum biotechnology: Quo vadis?. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32: 21-52.

- Teixeira da Silva, J. A., y Kulus, D. (2014a). Chrysanthemum biotechnology: discoveries from the recent literature. *Folia Horticulturae*, 26:67.
- Teixeira da Silva, J. A. (2014b). Novel Factors Affecting Shoot Culture of Chrysanthemum (*Dendranthemax Grandiflora*). *Botanica Lithuanica*, 20(1).
- Tejeda-Sartorius O., Y. Ríos-Barreto, L. I. Trejo-Téllez, and H. Vaquera-Huerta (2015) Caracterización de la producción y comercialización de flor de corte en Texcoco, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 6:1105-1118.
- Trolinger J. C, R. J. McGovern, W. H Elmer, N. A. Rechcigl and C. M. Shoemaker (2017) Diseases of Chrysanthemum: *In: Handbook of Florists' Crop Disease*. R. J. McGovern and W. H. Elmer (eds). Springer International Publishing AG. Berlin, Alemania. pp: 439-502. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5>
- Valle-Sandoval, M. R., Mascorro-Gallardo, J. O., & Gil-Vázquez, I. (2008). Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia*, 24:219-227.
- van Lent, J. W., y Schmitt-Keichinger, C. (2006). Viral movement proteins induce tubule formation in plant and insect cells. *Cell-cell channels*, 160-175.
- Végh, A., Némethy, Z., Salamon, P., Mándoki, Z., y Palkovics, L. (2014). First report of bacterial wilt on chrysanthemum caused by *Dickeya chrysanthemi* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Hungary. *Plant Disease*, 98(7), 988-988.
- Verhoeven, J. T. J., Roenhorst, J. W., Cortes, I., & Peters, D. (1996, March). Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. In *IX International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants* 432 (pp. 44-53).
- Verma, N., Sharma, A., Ram, R., Hallan, V., Zaidi, A. A., & Garg, I. D. (2003). Detection, identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India. *Crop Protection*, 22(2), 425-429.
- Verma, N., Ram, R., Hallan, V. A., Kumar, K., & Zaidi, A. A. (2004). Production of Cucumber mosaic virus-free chrysanthemums by meristem tip culture. *Crop Protection*, 23:469-473.
- Verma, L., Bains, N. S., y Gosal, S. S. (2015). Effect of ticarcillin, cefotaxime and carbenicillin doses on efficacy of tissue culture parameters associated with durum wheat transformation. *Vegetos*, 28(4), 89-93.
- Vijayalakshmi U., and A. Shourie (2016) Remedial effect of ascorbic acid and citric acid on oxidative browning of *Glycyrrhiza glabra* callus cultures. *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 97:179-186
- Vives K., I. Andújar, J. C. Lorenzo, O. Concepción, M. Hernández, and Escalona, M. (2017). Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 131:195-199.

- Wang, Q., Liu, Y., Xie, Y., Y You, M. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research*. 49:119-129.
- Wang Q. C., and J. P. T. Valkonen (2008a). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*. 154:135-145.
- Wang Q., W. J. Cuellar, M. L. Rajamäki, Y. Hirata and J. Valkonen (2008b). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: Relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol*. 9: 237–250.
- Wang, S. D., Zhu, F., Yuan, S., Yang, H., Xu, F., Shang, J., ... & Lin, H. H. (2011). The roles of ascorbic acid and glutathione in symptom alleviation to SA-deficient plants infected with RNA viruses. *Planta*, 234(1), 171-181.
- Wang, M. B., Masuta, C., Smith, N. A., y Shimura, H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1275-1285.
- Waswa, M., Kakuhenzire, R., y Ochwo-Ssemakula, M. (2017). Effect of thermotherapy duration, virus type and cultivar interactions on elimination of *Potato viruses X* and *S* in infected seed stocks. *African Journal of Plant Science*. 11: 61-70.
- Webster C. G., S. J. Wylie and M. G. Jones (2004) Diagnosis of plant viral pathogens. *Current science*. 1604-1607.
- Welander M., J. Persson, H. Asp and L. H. Zhu (2014) Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*. 179:227-232.
- Whitfield A. E., D. E. Ullman and T. L. German (2005) Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 43:459-489.
- Wise, K., Gill, H., y Selby-Pham, J. (2020). Willow bark extract and the biostimulant complex Root Nectar® increase propagation efficiency in chrysanthemum and lavender cuttings. *Scientia Horticulturae*, 263:1-15
- Wu J., Y. Ni, H. Liu, M. Ding and Zhou (2014) Monoclonal antibody-based serological assays and immunocapture-RT-PCR for detecting Rice dwarf virus in field rice plants and leafhopper vectors. *Journal of Virological Methods*, 195:134-140.
- Yan, K. R., Zhang, Y. H., Yang, C. B., Ma, C. N., He, B. W., & Mao, B. Z. (2020). First report of sweet potato feathery mottle virus infecting *Chrysanthemum morifolium* in China. *Plant Disease*, 104:3273-3273.
- Yang L., B. Nie, J. Liu and B. Song (2013) A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets *in vitro* using ELISA and quantitative RT-PCR. *American Journal of Potato Research*, 91:304-311.

- Yesmin S., A. Hashem, K. C. Das, M. M. Hasan and M. S. Islam (2014) Efficient in vitro regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture. *Nuclear science and applications*. 23:47-50.
- Yoon, J. B., Choi, S. K., Cho, I. S., Kwon, T. R., Yang, C. Y., Seo, M. H., y Yoon, J. Y. (2020). Epidemiology of tomato spotted wilt virus in *Chrysanthemum morifolium* in South Korea and its management using a soil-dwelling predatory mite (*Stratiolaelaps scimitus*) and essential oils. *Virus Research*. 289:198128.
- Yu Y. and Z. M. Wei (2008) Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. *Biologia Plantarum*, 52:553-556, <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0109-1>.
- Zhang H., Z. Lang and J. K. Zhu (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19:489-506.
- Zhang, J., Chen, S., Liu, R., Jiang, J., Chen, F., y Fang, W. (2013). Chrysanthemum cutting productivity and rooting ability are improved by grafting. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Zhao S. and Y. Li (2021) Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. *Plos Pathogens*, 17(2), e1009242.
- Zhu S., F. Gao, X. Cao, M. Chen, G. Ye, C. Wei and Y. Li (2005) The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiology*, 139:1935-1945, <https://doi.org/10.1104/pp.105.072306>
- Zhu P., D. Qi, Y. Duan, H. Mao, Y. Fu, Y. Yang and L. Qu (2010) Microscopic investigation of the infection cycle of chrysanthemum white rust pathogen. *Journal of Shenyang Agricultural University*. 41: 221-223.
- Zilka S., E. Faingersh, A. Rotbaum, Y. Tam, S. Spiegel and N. Malca (2002) In vitro production of virus-free pear plants. *Acta horticulturae*. 596:477-479. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.79
- Ziv M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. In: Liquid culture systems for in vitro plant propagation (pp. 79-93). *Springer*. Dordrecht.
- Ziska L. H., S. Panicker, and H. L. Wojno (2008) Recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide and the potential impacts on growth and alkaloid production in wild poppy (*Papaver setigerum* DC.). *Climatic change*. 91:395-403
- Zhao X., X. Liu, B. Ge, M. Li and B. Hong (2015) A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum. *Archives of Virology*, 160:1145-1152.