



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

---



**Centro Universitario UAEM Tenancingo**

**ERRADICACIÓN DE LOS VIRUS TSWV Y TAV EMPLEANDO ÁCIDO SALICÍLICO Y TERMOTERAPIA *in vitro* EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA**

**PRESENTA:**

**GLORIA ROGEL MILLÁN**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Dra. Marta Elena Mora Herrera**

**Tenancingo, Estado de México Abril de 2014**



Tenancingo, Estado de México; 25 de Marzo de 2014.

**GLORIA ROGEL MILLÁN  
PASANTE DE LA LICENCIATURA DE  
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA  
P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a Usted, que con base en el Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM que en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122, así como el Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM Capítulo I artículo 6º, puede proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de tesis denominada **“Erradicación de los virus TSWV y TAV empleando ácido salicílico y termoterapia *in vitro* en microplantas crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white”** y continuar con los trámites y requisitos requeridos para efecto de poder sustentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADA EN INGENIERA AGRÓNOMA EN FLORICULTURA.**

Sin otro particular, quedo a sus apreciables órdenes.

**Atentamente**  
**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**  
**“2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”**

**QUIM. VÍCTOR MANUEL DÍAZ VERTIZ**  
**SUBDIRECTOR ACADÉMICO DEL CENTRO**  
**UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**



C. c. p. L. T. Gemma Irais Nava Pedroza. - Encargada del Departamento de Evaluación Profesional.  
C. c. p. Archivo  
VMDV/vfr.





Tenancingo, México a 25 de Marzo de 2014.

**L. EN T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA**

**ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL**

**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**

**PRESENTE:**

En mi calidad de directora de la tesis titulada: “**Erradicación de los virus TSWV y TAV empleando ácido salicílico y termoterapia *in vitro* en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white**”, que presenta la **C. GLORIA ROGEL MILLÁN** pasante de Ingeniero Agrónomo en Floricultura; informo que se realizaron las correcciones sugeridas por los revisores, por lo cual ha concluido el proceso de escritura de dicho documento.

Sin más por el momento, quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

**DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA**

**PROFESORA DE TIEMPO COMPLETO**

**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**

c.c.p. Q. Víctor Díaz Vertiz. Subdirección Académica.

c.c.p Archivo





Tenancingo, México a 24 de Marzo de 2014

Asunto:  
Dictamen de revisión de trabajo de tesis.

L. en T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA  
ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO  
DE EVALUACIÓN PROFESIONAL DEL CENTRO  
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

El que suscribe: Juan Carlos Reyes Alemán le comunica que después de haber revisado la tesis denominada "Erradicación de los virus TAV y TSWV empleando ácido salicílico y termoterapia in vitro en microplantas de (*Dendranthema grandiflora*)", que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura somete la alumna Gloria Rogel Millán, he determinado el siguiente veredicto:

**Aprobado con comentarios**

Anexo a la presente la hoja de comentarios y el borrador del documento con correcciones, quedo de usted enviándole un atento saludo.

ATTE.

**Dr. Juan Carlos Reyes Alemán**  
**Profesor Investigador del Centro Universitario UAEM Tenancingo**

c.c.p. Quim. Victor Manuel Díaz Vertiz. Subdirector Académico del Centro Universitario UAEM Tenancingo.





## Hoja de comentarios

Del trabajo de tesis: “Erradicación de los virus TAV y TSWV empleando ácido salicílico y termoterapia in vitro en microplantas de (*Dendranthema grandiflora*)”, que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Floricultura en el Centro Universitario UAEM Tenancingo somete la alumna **Gloria Rogel Millán**.

Me parece un excelente trabajo, solo recomiendo realizar las correcciones que se indican al interior del borrador anexo.

Tenancingo, México a 24 de Marzo de 2014.



Tenancingo, México a 04 de marzo de 2014

**L. EN T. GEMMA IRAIS NAVA PEDROZA**  
**ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE**  
**EVALUACION PROFESIONAL**  
**P R E S E N T E:**

En relación a su designación como revisor de la tesis titulada: **“Erradicación de los virus TAV y TSWV empleando ácido salicílico y termoterapia *in vitro* en microplantas de (*Dendranthema grandiflora*)”**, de la pasante de Ingeniero Agrónomo en Floricultura **Gloria Rogel Millán** emito mi dictamen:

**Aprobada con comentarios.**

De manera general el trabajo aporta información importante para la continuación de trabajos de investigación en esta línea. Las sugerencias y comentarios se indican a continuación, además de las indicadas en el escrito y van en el sentido de mejorar el trabajo.

1. En antecedentes checar que los datos de las estadísticas de producción y valor de la producción reportados por el SIAP 2013, sean los correctos. Pag. 4
2. Incluir las malezas reportadas en México como hospederas alternas del virus TSW. Pag. 8
3. Poner los descriptores de los nombres científicos. Pag. 8
4. Indicar las referencias de las metodologías utilizadas en las pruebas de DAS-ELISA y plantas indicadoras Pag. 24
5. Texto justificado no centrado en cuadros y figuras (todo el texto).
6. Corregir la acentuación en todo el texto
7. Dar espacio en todo el texto
8. Corregir la bibliografía en el apartado de Literatura consultada pp. 49-60
9. El escrito cumple con el numero de paginas indicado en el reglamento de titulación

Sin más por el momento, quedo de Usted.

**ATENTAMENTE**

  
**DR. RÓMULO GARCÍA VELASCO**  
**PTC-INVESTIGADOR DEL CU TENANCINGO**

## DEDICATORIA

A Dios por ser mi gran inspiración, por darme la vida y por permitirme tener una familia que me apoyo a culminar esta meta.

### **Con mucho cariño**

*A mi papá* Gelasio Rogel Castro por ser una persona que admiro y respeto mucho, por su apoyo y cariño que en todos los momentos me ha brindado ¡Gracias papá!

*A mi mamá* Misaela Millán Millán por el gran amor que me tiene, por el apoyo que me ofrece y por los consejos que día a día me ha hecho una mejor persona ¡Gracias mami!

*A mis hermanos:* Abel, Octavio y Rosi, por estar siempre juntos y por aquellos momentos que me llenan de alegría.

*A mis cuñadas* Graciela e Ivonne, a mi cuñado Juan José, gracias a ustedes por llegar a llenar de mas alegrías a nuestra familia.

Dedicada muy especialmente a mis sobrinos que son como mis hermanos Tavito, Ingrid y Cristian, niños gracias por quererme tanto.

A Juan Chávez Martínez, por brindarme tu cariño, por tus consejos, gracias por estar junto a mí.

## AGRADECIMIENTOS

Al creador del universo: porque tú das el conocimiento y de ti viene toda sabiduría, fuente inagotable de amor que ilumina el sendero de mi vida; mi paz y serenidad en los momentos de incertidumbre.

A la virgen María: modelo perfecto de virtudes a seguir, por tu intercesión hoy logro una de mis metas más anheladas.

Al Centro Universitario, UAEM Tenancingo por ser la escuela que me formo.

Al financiamiento PROMEP, clave PROMEP/103.5/09/4195, para realizar este trabajo.

Mi especial agradecimiento a la Dra. Martha Elena Mora Herrera por brindarme el apoyo necesario, por su asesoría, paciencia y valiosas enseñanzas al realizar esta tesis.

Agradecimientos a toda mi familia, especialmente a mis papas Gelasio y Misaela por confiar en mí y darme más de lo que necesito muchas gracias.

A Juan Chávez Martínez por todos aquellos momentos felices que me inspiran a seguir adelante, gracias por ser la persona que me impulsa a seguir adelante.

A mis amigas Janet, Anayely, Nay, Liz, Yaz, Citlalli, Karen, gracias por compartir tantas aventuras, alegrías y tristezas conmigo.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1 Importancia del cultivo de crisantemo.....	4
2.2 Producción del cultivo de crisantemo.....	4
2.2.1 Problemas del cultivo de crisantemo.....	5
Plagas de mayor importancia en el cultivo de crisantemo.....	5
Enfermedades del cultivo.....	6
2.3 Virus.....	6
2.3.1 Sintomatología viral.....	7
2.3.1.1 Virus en crisantemo reportados en México.....	8
2.3.1.1.1 Virus bronceado del tomate ( <i>Tomato Spotted Wilt Virus</i> , TSWV).....	8
2.3.1.1.2 Virus de la aspermia del tomate ( <i>Chrysanthemum Aspermy Cucumovirus</i> , TAV).....	9
2.3.2 Diseminación de virus en crisantemo.....	10
2.3.2.1 Transmisión de virus por propagación vegetativa.....	10
2.3.2.2 Transmisión de virus por vectores.....	11
2.3.2.3 Transmisión de virus por semillas.....	12
2.3.2.4 Transmisión de virus por polen.....	12
2.4 Métodos de diagnóstico de virus.....	12
2.4.1 Métodos biológicos (Plantas indicadoras) .....	13
2.4.2 Método inmunológico (Técnica DAS-ELISA).....	13
2.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.....	14
2.4.4 Microscopia electrónica.....	14
2.4.5 Microscopia óptica.....	15
2.5 Métodos utilizados para la erradicación de virus. ....	15
2.5.1 Cultivo de meristemos.....	16

2.5.2 Termoterapia.....	16
2.5.3 Quimioterapia.....	17
2.5.4 Electroterapia.....	18
2.5.5 Crioterapia.....	18
2.5.6 Combinación de técnicas para la erradicación de virus en plantas.....	18
2.6 Otras alternativas para la erradicación de virus.....	19
2.6.1 Ácido salicílico.....	19
2.6.2 Efecto de ácido salicílico en la erradicación de virus.....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
6.1 Material biológico.....	24
6.2 Medio de cultivo.....	24
6.3 Solución de ácido salicílico (AS).....	25
6.4 Siembra <i>in vitro</i> .....	25
6.5 Condiciones <i>in vitro</i> .....	25
6.6 Condiciones de termoterapia.....	25
6.7 Condiciones de Invernadero.....	26
6.8 Descripción de los experimentos.....	26
6.8.1 Verificación del material vegetal positivo y/o negativo a los virus TSWV y TAV por la técnica DAS-ELISA contra la de Indexación.....	26
6.8.2 Efecto del AS en la termotolerancia <i>in vitro</i> de microplantas libres de virus.....	26
6.8.3 Efecto del AS en la termotolerancia <i>in vitro</i> de microplantas positivas a los virus TSWV y/o TAV. ....	26
6.9 Técnicas de diagnóstico.....	27
6.9.1 Técnica de plantas indicadoras.....	27
6.9.2 Prueba de DAS-ELISA.....	29

<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
7.1 Verificación del material vegetal positivo y/o negativo a los virus TSWV y TAV..	31
7.1.1 Resultados de la optimización de la técnica de indexación a los virus TSWV y TAV.....	32
7.1.2 EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS EN PLANTAS INDICADORAS.....	34
7.1.2.1 Expresión de síntomas en plantas de jitomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) por inoculación de los virus, TSWV, TAV Y TSWV-TAV. ....	34
7.1.2.1.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en jitomate. ....	34
7.1.2.1.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en jitomate. ....	36
7.1.2.1.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en jitomate. ....	36
7.1.2.2 Expresión de síntomas en plantas de <i>Nicotiana rustica</i> por inoculación de los virus, TSWV, TAV Y TSWV-TAV.....	37
7.1.2.2.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en <i>N. rustica</i> . ....	37
7.1.2.2.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en <i>N. rustica</i> .....	39
7.1.2.2.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en <i>N. rustica</i> .....	39
7.1.2.3 Expresión de síntomas en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> por inoculación de los virus, TSWV, TAV y TSWV-TAV.....	40
7.1.2.3.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en <i>N. tabacum</i> .....	40
7.1.2.3.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en <i>N. tabacum</i> .....	41
7.1.2.3.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en <i>N. tabacum</i> ....	42
7.2 Efecto del AS en la termotolerancia <i>in vitro</i> de microplantas libres de virus.....	43
7.3 Efecto del AS en la termotolerancia <i>in vitro</i> de microplantas positivas a los virus TSWV y/o TAV.....	45
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>9. LITERATURA CONSULTADA</b> .....	52
<b>10. ANEXOS</b> .....	64

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Síntomas evaluados en plantas indicadoras *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi L., *Nicotiana tabacum* L. var. Burley, *Nicotiana rustica*, *Lycopersicon esculentum*.

**Cuadro 2.** Resultados de la verificación de los virus TSWV y/o TAV mediante la prueba DAS-ELISA y plantas indicadoras.

**Cuadro 3.** Síntomas expresados en jitomate por la inoculación mecánica del TSWV, TAV y TSW-TAV presentes en crisantemo.

**Cuadro 4.** Síntomas expresados en *N. rustica* por la inoculación mecánica del TSWV y TAV.

**Cuadro 5.** Síntomas expresados en *N. tabacum* por la inoculación mecánica del TSWV y TAV.

**Cuadro 6.** Efecto del tratamiento de ácido salicílico sobre microplantas de crisantemo libres de los virus TSWV y TAV, sometidas a termoterapia.

**Cuadro 7.** Efecto del pretratamiento de ácido salicílico sobre microplantas de crisantemo positivas a TSWV y/o TAV expuestas a 37°C.

**Cuadro 8.** Efecto del ácido salicílico en la erradicación de virus de microplantas de crisantemo, verificadas por la técnica de DAS-ELISA.

**Cuadro 9.** Efecto del ácido salicílico en la erradicación de virus de microplantas de crisantemo, verificadas por indexación.

**Cuadro 10.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre jitomate por inoculación mecánica.

**Cuadro 11.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre *Nicotiana rustica* por inoculación mecánica.

**Cuadro 12.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre *Nicotiana tabacum* por inoculación mecánica.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Sistematización de técnica DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) con modificación para microplantas de *D. grandiflora* variedad Polaris White para los virus TSWV y TAV (Sánchez, 2012).

**Figura 2.** Efecto de la inoculación mecánica del TSWV en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

**Figura 3.** Efecto de la inoculación mecánica del TAV en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

**Figura 4.** Inhibición del crecimiento por la inoculación de TSWV-TAV en jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

**Figura 5.** A) Anillos cloróticos causados por la inoculación de TSWV y B) clorosis basal causada por la inoculación de TSWV sobre *Nicotiana rustica*.

**Figura 6.** A) Lesiones cloróticas y B) lesiones necróticas causadas por la inoculación del TAV sobre *Nicotiana rustica*.

**Figura 7.** A) Marchitez y B) anillos necróticos expresados por la inoculación de TSWV/TAV sobre *Nicotiana rustica*.

**Figura 8.** Manchas necróticas y clorosis severa causadas por la inoculación de TSWV sobre *Nicotiana tabacum*.

**Figura 9.** Clorosis causada por la inoculación de TAV sobre *Nicotiana tabacum*.

**Figura 10.** A) Manchas necróticas y B) clorosis severa causada por la inoculación de TSWV-TAV sobre *Nicotiana tabacum*.

**Figura 11.** Figura 11. Síntomas del crecimiento expresados por la inoculación de TSWV, TAV y TSWV-TAV sobre *Lycopersicon sculentum*, A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS y termoterapia.

**Figura 12.** Síntomas de clorosis y manchas por la inoculación de TSWV, TSWV-TAV sobre *Nicotiana rustica* A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS la termoterapia.

**Figura 13.** Síntomas de clorosis y manchas por la inoculación de TSWV, TSWV-TAV sobre *Nicotiana tabacum*. A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS la termoterapia.

## RESUMEN

Actualmente se ha observado que la gravedad de una enfermedad dada, se ve incrementada por los factores ambientales y por la sinergia de varias enfermedades ocasionadas por diversos organismos (virus, hongos, bacterias, fitoplasmas, etc.), que en un momento alguna o algunas de ellas estuvieron enmascaradas o asintomáticas, esto hace más difícil el control para una determinada enfermedad. Los virus ocasionan grandes pérdidas en los cultivos de importancia alimenticia y económica. La conservación, manejo y limpieza de materiales libres de virus son prácticas necesarias en programas de producción de semilla certificada en algunas especies como la papa. Diversas técnicas y alternativas se utilizan para reducir la incidencia de enfermedades ocasionadas por virus, las cuales están basadas; en el cultivo de meristemas, tratamiento de calor, tratamiento con bajas temperaturas, quimioterapia, electroterapia, entre otras. Estudios recientes han demostrado que el ácido salicílico participa en procesos fisiológicos de la planta, como la inducción de tolerancia a factores de estrés. En especies como papa, ha inducido tolerancia a temperaturas altas, por lo que se ha estudiado su función en la termoterapia en la erradicación de virus.

El objetivo principal de este trabajo fue obtener plantas libres de los virus *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) y *Chrysanthemum Aspermy Cucumovirus* (TAV) empleando ácido salicílico, cultivo de yemas y termoterapia *in vitro* en el crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, donde se evaluó la supervivencia (microplantas turgentes y no contaminadas), presencia o ausencia de virus y síntomas expresados en plantas indicadoras.

Se detectaron por serología (DAS-ELISA) y plantas indicadoras (se adecuaron las condiciones para la inoculación) a los virus TSWV y TAV en microplantas de crisantemo variedad Polaris white. Se empleo ácido salicílico (AS) como pretratamiento de la termoterapia *in vitro* para incrementar termotolerancia de las microplantas y la erradicación de los virus. Se subcultivaron microplantas negativas al TSWV y TAV en 0 y  $10^{-5}$  M de AS por 28 días, posteriormente se subcultivaron a medio MS sin AS y se expusieron a temperaturas de 37, 37.5 y 38°C por 25 días, evaluando solamente el

efecto del AS en la supervivencia de las microplantas, siendo más significativa en microplantas pretratadas con AS incrementando hasta un 20% con respecto al testigo, a una temperatura de 37°C, exponiendo las microplantas a una temperatura de 37.5°C el AS incremento la supervivencia 4.5% con respecto al testigo, las microplantas pretratadas y no pretratadas con AS expuestas a 38°C no sobrevivieron después de 15 días. De acuerdo a lo anterior se subcultivaron microplantas positivas a TSWV, TAV y TSWV-TAV en 0 y  $10^{-5}$  M de AS por 28 días posteriormente se subcultivaron en ausencia de AS y se expusieron a temperaturas de 37°C por 25-30 días. El AS incremento la supervivencia en microplantas positivas a TSWV, TAV y TSWV-TAV hasta en un 50.00, 6.06 y 10.63% respectivamente con referencia a los testigos. La verificación de los resultados de la prueba de DAS-ELISA fue comprobada nuevamente con plantas indicadoras la cual resulto negativa a los virus TSWV y TSWV-TAV. El AS junto con el cultivo de yemas y la termoterapia de manera general resulta efectivo para la eliminación de virus en el crisantemo variedad Polaris white.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Estado de México sobresale como uno de los principales productores de flor de corte, cuenta con una superficie sembrada de 4,945 ha; la delegación regional de Coatepec Harinas, integrada por los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo, Zumpahuacán, Malinalco e Ixtapan de la Sal, es la que concentra el 82% de la superficie total de la entidad productora de flor y ornamentales, el crisantemo ocupa el tercer lugar de importancia económica (Orozco y Mendoza 2003). En el 2005 produjo 8,731,240 gruesas (una gruesa son doce docenas) estas flores y sus variedades principalmente Polaris white, son las más cotizadas ya que tienen alta demanda en el mercado por ser una flor tradicional (Soto y García, 2006); la calidad de las flores depende de muchos factores como el manejo agronómico de la planta y del control de plagas y enfermedades (Mendoza, 2002).

En este cultivo se han reportado trece enfermedades causadas por hongos, cuatro por bacterias, seis por virus y una por un agente tipo fitoplasma, muchas de estas enfermedades son propagadas por insectos plaga (Horts y Nelson, 1997 en García, 2001), que disminuyen su rendimiento y elevan los costos de producción. En México las principales enfermedades que afectan a este cultivo están las ocasionadas por virus y hongos (Cárdenas-Alonso, 1994).

Se ha detectado que uno de los grandes inconvenientes para la propagación de crisantemo es que no se cuenta con conocimiento del estado de sanidad del material que se está produciendo, ni del material que se está usando para iniciar nuevas plantaciones (Barrios *et al.*, 2006).

Los principales virus que afectan al crisantemo (*Dendratema x grandiflorum*) son: virus de la aspermia del crisantemo o *Chrysanthemum Aspermy Cucumovirus* (TAV) y *Tomato Spotted Wilt Tospovirus virus* (TSWV), entre otros (Ram *et al.*, 2007), estos virus se han reportado en las zonas productoras de crisantemo del Estado de México (Aquino, 2005). Los síntomas y enfermedades ocasionadas por los virus en las plantas son difíciles de identificar y por lo tanto de erradicar ya que no existen formas eficaces de control porque muchas veces son asintomáticos.

El método de detección del TSWV y TAV frecuentemente es por la técnica serológica DAS-ELISA en plantas con y sin síntomas (Aquino, 2005), para tener una certeza del 100% de ausencia o presencia de un virus se puede recurrir a la realización de otra prueba que pueden ser las plantas indicadoras, las cuales son utilizadas actualmente en el cultivo de papa para certificar una planta libre de virus.

Dentro del manejo integrado del cultivo de crisantemo para obtener semilla agronómica libre de plagas y enfermedades se incluye el cultivo *in vitro*, esta herramienta ha resultado útil para la propagación masiva (clonación) de material libre de patógenos (Kackar *et al.*, 1993) y además en la limpieza, renovación y rejuvenecimiento de plantas madre en los cultivos. Entre las diversas prácticas y alternativas para la erradicación de virus están las que tienen como base principal el cultivo *in vitro*: el empleo de meristemas apicales, tratamientos de calor (termoterapia) y/o quimioterapia ya que proporcionan modelos y técnicas de eliminación (Albouy y Devergne, 2000; López *et al.*, 1985; López-Delgado, *et al.*, 2004).

Las enfermedades virales son un reto muy importante para la producción no solo de ornamentales, sino para la de cualquier otra planta que sea susceptible a los virus. En el crisantemo se convierten en un factor importante porque la modalidad de siembra es a través de esquejes y si una planta está infectada de virus de forma sistémica, los esquejes tomados de esas plantas darán origen a nuevas plantas infectadas. Las nuevas plantas pueden no desarrollarse, tener características anormales a la variedad de crisantemo lo cual las hace no deseables para su adquisición, pueden morir o bien ser más sensibles a otras enfermedades. Esto causa problemas a los agricultores por las pérdidas que representan.

Trabajos realizados en papa (López-Delgado *et al.*, 2004) han demostrado que la inclusión de yemas axilares a condiciones *in vitro* en combinación con termoterapia y uso de ácido salicílico incrementan el porcentaje de plantas libres de virus a diferencia del método tradicional de cultivo de meristemas; una vez que se han obtenido microplantas libres de virus estas se pueden micropropagar lo cual es económicamente viable, inclusive puede ser más económico que otras técnicas de propagación vegetativa. El propósito de este proyecto fue la obtención de plantas libres de virus a

través de la implementación de la termoterapia con ácido salicílico a 37°C y el cultivo de meristemas *in vitro*. La razón principal fue obtener una metodología de erradicación de virus en crisantemo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia del cultivo de crisantemo

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) es una planta originaria de Asia oriental, pertenece a la familia Asteraceae, es considerada como una de las flores de mayor importancia económica y comercial (Pandya y Saxena, 2001), se cultiva en todo el mundo y es apreciada por la forma y el tamaño de las flores, diversidad de colores, larga vida de florero y su producción continua durante todo el año, así como su versatilidad de uso (Kumar, 2008).

El crisantemo es una especie ornamental para maceta y flor de corte con alta demanda en el mercado (Enríquez *et al.*, 2005). En México, el cultivo reviste gran importancia dentro de la flor de corte, al ocupar el tercer lugar en lo que respecta a especies más demandadas después de las rosas y los claveles (Esquivel *et al.*, 2005).

El crisantemo en el Estado de México en el año 2010 reportó una superficie de 2,379 ha sembradas alcanzando un valor de 451.25 miles de pesos por hectárea, en el 2011 se reportó una superficie de 2,236 ha sembradas alcanzando un valor de 382.92 miles de pesos por hectárea. Para el municipio de Villa Guerrero en el año 2011 se reportó una superficie de 1627 ha sembradas alcanzando un valor de 383.25 miles de pesos por hectárea, lo que representa el 72.82% de la producción que se reportó para el Estado de México (SIAP, 2013).

### 2.2 Producción del cultivo de crisantemo

Las plantas de crisantemo se propagan vegetativamente, mediante esquejes homogéneos en edad y tamaño, que se extraen de plantas que se mantienen en desarrollo vegetativo, a los cuales se les aplica en su extremo basal un compuesto a base de auxinas promotoras de raíz antes de ser establecidos en sustratos ligeros con buen drenaje y aireación en invernadero o cubiertas plásticas (Enríquez *et al.*, 2005). Tienen un ciclo de 90 a 120 días a partir de la plantación y su fertilización debe

proporcionarse de acuerdo a la etapa fisiológica del cultivo y época del año (Arbos, 1992).

El material vegetal utilizado en México para el establecimiento de los cultivos florícolas, en general, proviene del extranjero, lo que repercute en el incremento de los costos de producción (Olivera *et al.*, 2000). Durante los varios ciclos de propagación los patógenos pueden reducir la calidad sanitaria y vigor de las plantas, así como la calidad y valor comercial de las flores cosechadas (Enríquez *et al.*, 2005).

### **2.2.1 Problemas del cultivo de crisantemo**

Los cultivos suelen verse afectados por distintas plagas y enfermedades que ponen en peligro el rendimiento y la estabilidad de sus producciones, entre estos destacan los insectos, que además de producir un daño directo reduciendo la cosecha producen un importante deterioro y pérdida de la calidad del producto final. Como consecuencia de las altas densidades de población de insectos vectores de virus vegetales, las enfermedades causadas por estos suponen un problema de importancia creciente en todo el mundo, por detrás de las enfermedades causadas por hongos (Hull, 2002).

El cultivo de crisantemo tiene problemas fitosanitarios que afectan la producción y la calidad en el ciclo del cultivo (Bautista *et al.*, 2002). A nivel mundial se reportan trece enfermedades causadas por hongos, cuatro por bacterias, seis por virus y un fitoplasma, muchas de estas enfermedades son propagadas por insectos plaga (García, 2001).

### **Plagas de mayor importancia en el cultivo de crisantemo**

En la zona de Villa Guerrero para el cultivo de crisantemo las plagas más comunes son: trips (Thysanoptera: Thripidae), afidos (Homoptera: Aphididae), mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) y minadores (Diptera: Agromycidae) (Ochoa-Martínez *et al.*, 1999).

## Enfermedades del cultivo

Dentro de los hongos más importantes reportados en este cultivo se encuentran: *Erisiphe cichoracearum* DC. ex Merat., *Puccinia horiana* Henn., *Puccinia tanacetii* Sacc., *Septoria chrysanthemella* Sacc. y *Septoria obesa* Syd., (Horst y Nelson, 1997), *Alternaria solani* (Agrios, 2005) *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Alternaria chrysanthemi* E. G. Simmons & Crosier y *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Ness: Fr) Wiltshire (Aurun Kumar *et al.*, 2011).

Las bacterias reportadas en este cultivo son: *Erwinia chrysanthemi* (Tizón bacteriano), *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas cichorii* y una bacteria fitopatogena Gram negativa reportada en crisantemo Harmn (Aranda, 2002; Valencia, 2011).

Los virus más importantes son: *Chrysanthemum (Tomato) aspermy cucumovirus* (CAV o TAV), *Chrysanthemum mosaic-B (Q) carlavirus* (CVB), *Chrysanthemum D, E carlavirus*, *Chrysanthemum latent carlavirus*, *Chrysanthemum mil mottle cucumovirus* (CMMV), *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CCMVd) (Albouy y Devergne, 2000).

## 2.3 Virus

Los virus son entidades acelulares, y por tanto no encajan en los sistemas de clasificación actuales de los organismos. Los virus se replican dentro de ciertas bacterias, células de plantas y animales, por lo que pueden causar enfermedades, y frecuentemente están mutando. Todos los virus tiene la misma anatomía básica: una cápsula externa compuesta de subunidades proteicas y un núcleo interno de ácido nucleico, ya sea DNA (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico), pero no ambos a la vez. La clasificación de los virus es por: su tipo de ácido nucleico, tamaño, forma y por la presencia o ausencia de envoltura externa (Mader, 2008).

La replicación viral se logra cuando un virus entra a una célula hospedera y se adhiere a manera de cerradura a un receptor en la superficie externa de la célula hospedera y es donde el ácido nucleico viral entra a la célula, y una vez dentro se codifica, alterando

el mecanismo metabólico de la célula huésped (Mader, 2008). En el mecanismo metabólico los virus no matan a sus hospederos de forma directa, si no que generan sustancias ajenas al hospedero y alteran diversas funciones vitales e inducen el desarrollo de síntomas (Rosales *et al.*, 2011).

Los virus vegetales son partículas intracelulares obligados, lo que significa que no se replican fuera de una célula viva y requieren moverse de una planta susceptible a otra, en lo que se denomina proceso de transmisión viral (Hull, 2002; Plumb, 2002).

Para subsanar la incapacidad de penetrar a través de la epidermis intacta de las plantas, los virus han desarrollado diversas estrategias como la trasmisión por polen o semilla, o mediante propagación vegetativa de las plantas. Pero sin duda, es la trasmisión mediante vectores la más empleada por los virus vegetales para transmitirse de un hospedero a otro (Hull, 2002; Plumb, 2002).

### **2.3.1 Sintomatología viral**

La diversidad de síntomas virales que pueden observarse en campo depende de varios factores tales como: el hospedante, edad, época del año, estado fisiológico, entre otros (Germán *et al.*, 1992; Aquino, 2005).

En lo que se refiere a los daños que provocan los virus en la agricultura, principalmente se afecta el vigor y el rendimiento. A ello se le añade un efecto depresivo sobre la calidad de la producción que es particularmente pernicioso en el caso de las especies ornamentales (Albouy y Devergne, 2000).

Generalmente en los crisantemos no se aprecian síntomas en hojas, aunque regularmente aparece un jaspeado, reducción del crecimiento y rara vez enanismo; estos síntomas comúnmente se presenten en combinación de dos virus; el de la aspermia del tomate y del mosaico (Aquino, 2005).

### 2.3.1.1 Virus en crisantemo reportados en México

En el crisantemo, los síntomas del debilitamiento son más intensos entre 26 y 29°C y con una fuerte iluminación o radiación, pero son menos severos bajo condiciones de cultivo de días cortos que permiten la inducción floral (Handley y Horst, 1988).

Barrios *et al.* (2006), indican que los virus más prevalentes en los cultivos de crisantemo fueron el virus bronceado del tomate (TSWV), el virus de la aspermia del tomate o crisantemo (TAV) y el virus B del crisantemo o virus del mosaico del crisantemo (CBV).

#### 2.3.1.1.1 Virus bronceado del tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV)

Este virus pertenece a la familia Bunyaviridae y es capaz de infectar un gran número de especies hortícolas de importancia económica, aunque a nivel mundial es capaz de infectar más de 900 especies distribuidas en 80 familias, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas (Jae-Hyun *et al.*, 2004).

El TSWV pertenece al género *Tospovirus*, con partículas isométricas de 70-90 nm de diámetro. Desde 1980 ha ocurrido una rápida distribución geográfica del TSWV, que fue precedida por la expansión de su principal insecto vector, el trips *Frankliniella occidentalis*, cuya abundancia y distribución se ha relacionado con la incidencia de este virus (Reddy y Wightman, 1988; Goldbach y Peters, 1994).

El TSWV es considerado uno de los diez virus más importantes que infecta sistemáticamente y mecánicamente (Jones, 2000). Dentro de sus hospedantes susceptibles se encuentran plantas de importancia agrícola como chícharo (*Pisum sativum* L.), cacahuate (*Arachys hypogaea* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), apio (*Apium graveolens* L.), y numerosas especies de plantas ornamentales como crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.), dalia (*Dahlia* sp.), gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus) e iris (*Iris* spp.) (Best, 1968). El TSWV se ha encontrado en plantas silvestres, perennes y anuales, las que funcionan como

reservorios naturales y como fuentes de inóculo primario (Yudin *et al.*, 1988; Bond *et al.*, 1993). Se ha destacado que numerosas especies de malezas entre las que destacan de las familias: Asteraceae, Malvaceae, Amaranthaceae, Solanaceae, Brassicaceae y Chenopodiaceae asociadas a cultivos; son hospedantes naturales de trips y la principal fuente de inóculo del TSWV (Groves *et al.*, 2002; Heinz *et al.*, 2013).

Particularmente, en el crisantemo variedad Polaris, los síntomas se manifiestan preferentemente en altas temperaturas y más comúnmente al momento de la aparición de los botones florales. El síntoma característico que produce el TSWV en esta variedad de crisantemo consiste en necrosis sistémica en tallo que impide el paso de nutrimentos y posteriormente clorosis generalizada, marchitamiento y muerte de la planta (Cárdenas-Alonso, 1994). En la zona de Villa Guerrero, la enfermedad ha provocado pérdidas de hasta un 90%; presentándose todo el año, pero parece ser más severa en las plantaciones de mayo a junio (Ochoa-Martínez *et al.*, 1999).

La técnica más usada para la detección de este virus en plantas asintomáticas es la técnica DAS-ELISA (Aquino, 2005).

### **2.3.1.1.2 Virus de la aspermia del tomate (*Chrysanthemum Aspermy Cucumovirus*, TAV)**

Este virus pertenece a la familia Bromoviridae, teniendo una amplia gama de huéspedes, infecta a más de 100 especies de dicotiledóneas en 24 y 3 familias de monocotiledóneas, aunque por lo menos 75 de estas especies se encuentran en las familias Chenopodiaceae, Compositae y Solanaceae (Hollings y Stone, 1971).

El TAV pertenece al género *Cucumovirus*, por lo que es un virus que contiene ARN con partículas isométricas de 30 nm de diámetro. Cuenta con un amplio rango de hospederos, se transmite fácilmente por varias especies de áfidos en la forma no persistente, y por inoculación de savia y generalmente no infecta sistémicamente (Jones, 2000).

Los daños principales que provoca este virus son: ruptura de la flor, enanismo y malformación, pero los síntomas de flores no pueden desarrollarse en el mismo año de la infección. La mayoría de las variedades no presentan síntomas en las hojas ni pérdida de vigor vegetativo (Brierley, 1955; Govier, 1957; Hollings y Stone, 1971).

Los síntomas del TAV consisten en una variedad de estrías, y grandes deformaciones de las flores liguladas, los capítulos de tamaño reducido y las inflorescencias adquieren un aspecto crispado, aunque generalmente esta sintomatología solo aparece cuando existen otros virus (Brierley, 1955; en Aquino, 2005), como *Chrysanthemum mosaic-B (Q) carlavirus* (CVB) (Espinoza, 2012).

### **2.3.2 Diseminación de virus en crisantemos**

El proceso de diseminación de los virus se inicia cuando el virus encuentra una herida en la pared celular (Rosales *et al.*, 2011). La diseminación de los virus puede ser provocada por: vectores biológicos como los artrópodos, nematodos, hongos o plasmodioforales. Con frecuencia, también están ligados a las actividades humanas a través de las prácticas de cultivo (multiplicación vegetativa, injerto, etc.), transmisión mecánica y por semilla o a los intercambios comerciales (Albouy y Devergne, 2000).

#### **2.3.2.1 Transmisión de virus por propagación vegetativa**

Las especies multiplicadas vegetativamente (injerto, esquejes, tubérculos, bulbos o rizomas) conservan al virus en su descendencia (Rosales *et al.*, 2011). Aunque las virosis sean enfermedades generalizadas, la distribución del virus en la planta infectada es a veces heterogénea; algunos tejidos u órganos no las contienen o las contiene poco, como el caso de los tejidos meristemáticos. Al ser las virosis enfermedades generalizadas, todos los órganos utilizados comúnmente en la multiplicación vegetativa procedentes de plantas-madre infectadas pueden transmitir la enfermedad a su descendencia (Albouy y Devergne, 2000).

### 2.3.2.2 Transmisión de virus por vectores

La transmisión por insectos vectores constituye un proceso esencial en el ciclo de vida de un gran número de virus, pero a la vez supone un mecanismo de reducción de la diversidad genética de dichos virus, ya que solamente aquellos que cumplan ciertos requerimientos de compatibilidad con el vector serán transmitidos (Power, 2000).

La transmisión por vectores no es un simple transporte pasivo de virus, sino un proceso complejo, en el que se establece una relación hospedero-virus-vector, pudiéndose dar incluso la multiplicación del virus en el propio vector. Son las características de estas relaciones las que determinan el tipo de transmisión viral (Nault, 1997; Ng y Perry, 2004).

La diseminación de muchos virus depende muchas veces de vectores biológicos, teniendo en cuenta las relaciones biológicas virus-vectores. Del periodo de retención del virus en el vector, se han clasificado en: virus no persistentes, semipersistentes y persistentes (Tabla 1; Albouy y Devergne, 2000).

**Tabla 1.** Clasificación de los tipos de transmisión de virus de plantas<sup>a</sup> Adaptado de Ng y Falk 2006.

<u>Características</u>	<u>Tipos de Transmisión</u>			
	NO PERSISTENTE <sup>b</sup>	SEMPERSISTENTE <sup>b</sup>	PERSISTENTE CIRCULATIVA	PERSISTENTE PROPAGATIVA
Duración de la fase de adquisición	Segundos Minutos	Minutos Horas	Horas	Horas
Fase de latencia: necesidad/duración	No	No	Horas	Días Semanas
Duración de la fase de retención	Minutos	Horas Días	Días De por vida	Días De por vida
Necesidad de traspaso de barreras celulares en el vector	No	No	Si	Si
Capacidad de replicación en el vector	No	No	No	Si
Ejemplos de grupos taxonómicos de virus	<i>Potyvirus</i> <i>Cucumovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i> <i>Closteroviridae</i>	<i>Luteoviridae</i> <i>Geminiviridae</i>	<i>Tospovirus</i>

<sup>b</sup>En el caso de transmisión mediada por hemípteros (pulgones, mosca blanca, cicadélidos, etc.) la transmisión no persistente se asocia con retención del virus en el estilete, mientras que en la semipersistente se ha postulado que la retención podría tener lugar en el aparato digestivo anterior aunque no existen evidencias experimentales que lo demuestren (Nault, 1997).

### **2.3.2.3 Transmisión de virus por semillas**

La transmisión por semillas constituye uno de los factores más importantes en el desarrollo epidémico de algunos virus. Las semillas infectadas dan origen a plántulas que representan una fuente de inóculo inicial temprano que además se encuentra uniformemente distribuido. Las plántulas infectadas constituyen reservorios a partir de los cuales ocurre la dispersión secundaria de los virus, lo cual sucede por transmisión mecánica o mediante vectores. La gran mayoría de los virus que se transmite por semilla, persisten en el embrión (Rosales *et al.*, 2011).

### **2.3.2 4 Transmisión de virus por polen**

Cuando una planta está infectada, el virus tiene la capacidad de llegar a infectar el polen y cuando este es acarreado por el viento o por insectos el virus se transmite de una planta enferma a una sana por este medio. La transmisión por medio del polen está muy relacionada con la transmisión de virus por semilla (Rosales *et al.*, 2011).

## **2.4 Métodos de diagnóstico de los virus**

El diagnóstico de virus en vegetales, experimentó una mejora cualitativa con la indexación biológica a finales de los 70, cuando se adoptó la técnica de análisis inmunoenzimático ELISA a la detección mediante anticuerpos específicos de los antígenos virales (Clark y Adams, 1977). Posteriormente, en los 80, se aplicaron distintas técnicas de detección de ácidos nucleicos en la virología vegetal (Hull, 2002), pero no fue hasta finales de esta década y principios de los 90 cuando tuvo lugar la verdadera revolución en la detección viral con la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; Mullis *et al.*, 1986) y su derivada la RT-PCR donde la amplificación va precedida de la acción de una transcriptasa inversa (Nicolas y Lalibertè, 1991; Jones *et al.*, 1991; Rizos *et al.*, 1992). Diferentes variantes de las

técnicas han sido empleadas para la detección de virus vegetales tanto en material vegetal como en sus vectores (Olmos *et al.*, 2002).

Cada método posee ventajas y desventajas por lo que en la mayoría de los casos es necesario utilizar más de uno de ellos para la detección de virus (De Blas, *et al.*, 1996).

#### **2.4.1 Métodos biológicos (Plantas indicadoras)**

Las plantas indicadoras son un método que ha sido utilizado frecuentemente para descubrir la presencia de virus en una planta; basado en la transmisión experimental del agente patógeno en plantas-test. Esta indexación, denominada a veces “biológica”, por estar basada únicamente en las propiedades infecciosas del virus, utiliza “plantas indicadoras” de las que se conoce su reacción a ser infectadas por el virus que se desea detectar, las especies más utilizadas son; los quenopodios (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*), tabacos (*Nicotiana tabacum*, *N. clevelandii*) y otras plantas diversas de las familias Solanaceae, Cucurbitaceae y Fabaceae (Albouy y Devergne, 2000).

#### **2.4.2 Método inmunológico (Técnica DAS-ELISA)**

Las técnicas serológicas o inmunológicas se basan en las propiedades antígenas de las proteínas virales, utilizando anticuerpos o inmunoglobulinas (Albouy y Devergne, 2000). La prueba ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) es el método serológico más usado actualmente, dada su alta sensibilidad, rapidez y evaluación cuantitativa del virus (Conti *et al.*, 2001). La principal característica de esta prueba inmunológica, es su especificidad, que es la de la reacción antígeno-anticuerpo, existen varios protocolos, aunque el más utilizado es conocido con el nombre de *Double Antibody Sandwich* (DAS-ELISA, por sus siglas en inglés) en el que el antígeno se encuentra colocado entre dos capas de anticuerpos específicos: una capa de anticuerpos de captura adsorbidos sobre un soporte y una capa de anticuerpos de detección marcados con la enzima (conjugado). La presencia de anticuerpos marcados

que están acoplados al virus se revela por un sustrato correspondiente a la enzima utilizada. La hidrólisis enzimática de este sustrato se traduce en una reacción coloreada observable a simple vista o medida con el auxilio de un espectrofotómetro (Albouy y Devergne, 2000).

Las ventajas de las pruebas de ELISA radican en su gran sensibilidad, el gran número de muestras que pueden analizarse, en la pequeña cantidad de antiseros que se utiliza, en que los resultados obtenidos son cuantitativos, y que el proceso puede programarse de manera automática en que dichas pruebas pueden realizarse sin importar la morfología y la concentración del virus (Agrios, 2005).

Se tienen reportes que indican que la prueba de ELISA para la detección de virus puede tener cierto margen de error, si la concentración es baja, por lo que se recomienda como prueba más eficaz el uso de plantas indicadoras, para asegurar la presencia o ausencia de los virus, o el uso de ambas (Ram *et al.*, 2007).

#### **2.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de un segmento de DNA utilizando la enzima DNA polimerasa y cebadores (oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia a amplificar). Se utiliza para la detección de secuencias nucleotídicas virales (McPherson *et al.*, 1991). El protocolo comprende tres etapas sucesivas, realizadas en diferentes condiciones térmicas; etapa de desnaturalización, etapa de hibridación y etapa de extensión. La repetición de varios ciclos desnaturalización-hibridación-extensión es la que conduce a una acumulación exponencial de DNA (Albouy y Devergne, 2000), que puede ser detectado por electroforesis (Klug *et al.*, 2006).

#### **2.4.4 Microscopia electrónica**

En la mayor parte de los casos, los exámenes de microscopia electrónica que revelan solamente la forma y el tamaño (a veces la estructura) del virus son claramente

insuficientes para conducir a una identificación (Albouy y Devergne, 2000). La microscopía electrónica tiene dos grandes ventajas, la rapidez con la cual se puede obtener resultados, y la evidencia visual convincente, inequívoca, sin embargo, depende de la habilidad para preparar y manejar las muestras, sin alterar las partículas virales (Salazar, 1995).

#### **2.4.5 Microscopía óptica**

En la actualidad existen métodos para detectar los virus mediante microscopía óptica. Naturalmente no permiten la visualización individualizada de los virus, sino la presencia de grandes acúmulos de material vírico intracelular, que pueden teñirse y constituyen los denominados cuerpos de inclusión. La utilización de anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes permite detectar en las células infectadas los antígenos víricos específicos formando acúmulos o distribuidos de forma difusa. Este tipo de observaciones puede hacerse tanto sobre tejidos infectados naturalmente como sobre cultivos celulares inoculados en el laboratorio

(<http://www.saberdeciencias.com.ar/index.php/apuntes-de-virologia/180-virologia-diagnostico-virologico-metodos-directos>).

#### **2.5 Métodos utilizados para la erradicación de virus**

Una práctica útil para el control de los agentes virales, es el manejo de semilla agronómica (clonación) certificada, libre de virus, el método más eficaz y económicamente viable es el cultivo *in vitro* (Valenzuela *et al.*, 2003; Agrios, 2005).

La mejor forma de mantener los cultivos en plantas libres de virus, es el establecimiento de material certificado y su continua inspección respecto a determinados virus (Razdan, 2003).

Para reducir la incidencia de enfermedades ocasionadas por virus se usan varios compuestos y/o biotecnologías (Albouy y Devergne, 2000). Los principales métodos para la erradicación de virus están basados en el cultivo *in vitro* y son: cultivo de

meristemas, tratamiento de calor (termoterapia) y/o quimioterapia (López *et al.*, 1985; Horst, 1990), hidroterapia (Hernández *et al.*, 1995), electroterapia (Hernández, 1997), y el tratamiento de meristemas con temperatura extremadamente baja (crioterapia) también han sido aplicados en la eliminación viral de plantas de papa en los últimos años (Wang *et al.*, 2006).

### **2.5.1 Cultivo de meristemas**

Los meristemas no poseen elementos vasculares desarrollados y se dificulta el transporte de partículas virales, además poseen una alta capacidad de división que va en detrimento de la multiplicación del virus, produciendo una dilución de éste en la planta (Luppichini, 2000).

El cultivo de meristemas ha sido ampliamente utilizado para eliminar los virus de la vida dentro de programas de certificación. Mientras más pequeño es el tamaño del explante, mayor es la posibilidad de eliminación de patógenos. Si se usa en combinación con la termoterapia o quimioterapia, puede aumentarse la posibilidad de producir plantas libres de virus (Castillo, 2001).

### **2.5.2 Termoterapia**

La termoterapia consiste en mantener plantas a una temperatura que inactiva al virus de manera que el tejido nuevo queda libre del agente causal de la enfermedad (Arancibia, 1986). Las plantas pueden sobrevivir a temperaturas más altas que los virus; si se mantienen a temperaturas entre 35-45°C por períodos determinados, los virus no se multiplican, porque la temperatura los inactiva, mientras que las plantas sobreviven (Converse, 1994). Las plantas producen tejidos libres de virus, y estos pueden ser extraídos y aislados (Luppichini, 2000).

La termoterapia permite la aceleración de los procesos para obtener plantas sanas, debido a que los tratamientos se pueden realizar durante todo el año y muchas plantas

pueden ser tratadas al mismo tiempo, así se incrementa el porcentaje de supervivencia de clones sanos (Gella *et al.*, 1998).

### 2.5.3 Quimioterapia

Las virosis nunca han podido ser combatidas de manera directa por vías químicas. Si bien se han citado casos de erradicación de virus por quimioterapia (asociados frecuentemente al cultivo *in vitro*). Los ensayos con dichas moléculas se clasifican en inhibidores de infección y de replicación, cuando se incorporan estas sustancias al medio de cultivo *in vitro*, detienen la multiplicación vírica y aumentan la tasa de regeneración, de esta forma la ribavirina, más conocida por el nombre comercial de “virazol” es uno de los inhibidores víricos de muy amplio espectro de acción (Albouy y Devergne, 2000). En los vegetales, este producto ha permitido sanear un cierto número de plantas entre ellas árboles frutales (Deogratias *et al.*, 1988), orquídeas (*Cymbidium*) (Albouy *et al.*, 1988) y plantas bulbosas (azucena) (Blom-Barnhoorn y Van Aartrijk 1985). La amantadina o 1-amantanamina, que también es eficaz contra virus gripales, ha permitido obtener plántulas de crisantemo negativas al viroide del debilitamiento (CSVd; Horst y Cohen, 1980).

Los productos químicos antivirales para la eliminación de los virus más conocidos son el virazol y la denosina arabinosida, productos que, exhiben una pronunciada fitotoxicidad a concentraciones efectivas. El uso de estos productos ha sido positivo para la reducción de la concentración de virus, pese a lo cual en muchos casos, no se ha conseguido una verdadera erradicación. Esta reducción en la concentración del virus puede ser un tratamiento previo para producir plantas más vigorosas que luego son tratadas por termoterapia (CIP, 1987).

Según Matthews (1991), los intentos de sanear una planta con virus, únicamente mediante tratamientos con productos químicos no han tenido éxito. Sin embargo, la quimioterapia puede ser muy útil cuando se desea mejorar el resultado obtenido al regenerar material libre de virus, mediante cultivo de meristemas o cuando aparecen virus que no pueden ser erradicados simplemente por este método.

#### 2.5.4 Electroterapia

El uso de corriente eléctrica para influir en el crecimiento de células, tejidos, bacterias, virus animales, llamada también electroterapia no es muy conocida, al respecto Weiss (1922; en Dena, 1997), menciona que las corrientes de alta frecuencia como una posibilidad para lograr atenuar virus y bacterias.

En caña de azúcar se reportó saneamiento, para bacterias y virus, de un 78% a un 100%, por tratamiento eléctrico; estos tratamientos se hicieron previos al cultivo de ápices *in vitro* (Hernández *et al.*, 1996).

#### 2.5.5 Crioterapia

Recientemente se ha demostrado que los virus podrían ser efectivamente erradicados por la conservación de meristemas con temperaturas extremadamente bajas (Brison *et al.*, 1997; Helliott *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006); como en el caso de yemas de papa ha donde este método es utilizado rutinariamente al menos en 125 genotipos (Schafer-Menuhr, 1996).

#### 2.5.6 Combinación de técnicas para la erradicación de virus en plantas

El empleo de altas temperaturas (termoterapia) y compuestos antivirales (quimioterapia) junto con la propagación de las plantas mediante el aislamiento de ápices meristemáticos caulinares o segmentos nodales aplicados en forma independiente o combinada han sido los métodos más utilizados frecuentemente para la eliminación de virus de plantas de papa en los últimos cuarenta años (Nacimiento *et al.*, 2003). Castillo (2001), al respecto menciona que la combinación de técnicas para el saneamiento de virus puede aumentar la posibilidad de producir plantas libres de virus.

## 2.6 Otras alternativas de erradicación de virus.

Si bien los métodos de erradicación de virus han permitido la obtención de plantas libres de virus, se han detectado especies menos tolerantes al tratamiento térmico o químico, los cuales afectan negativamente la supervivencia de las plantas tratadas y dificultan la obtención de plantas libres de virus (Sánchez *et al.*, 1991). Además, estos métodos requieren un período de cuatro a ocho meses e insumos costosos para obtener plantas que puedan ser evaluadas respecto a la presencia o ausencia del virus. Estos problemas dificultan la aplicación eficiente de los métodos mencionados en programas de saneamiento viral. Finalmente, la necesidad de obtener plantas libres de virus para ser propagadas masivamente o conservadas en bancos de germoplasma plantea la utilización de un método efectivo en un gran número de especies.

El problema de la erradicación de virus principalmente es debido a que no hay una técnica 100% eficaz y que además cada especie vegetal requiere condiciones especiales, de ahí que recientemente se hace uso de otros compuestos y alternativas para la erradicación. Algunos estudios han encontrado que el ácido salicílico (AS) participa en las respuestas a estrés en plantas, ha sido estudiado en respuestas de tolerancia a temperaturas altas, y esta propiedad ha sido utilizada en la termoterapia para la erradicación de virus en papa (López-Delgado *et al.*, 2004; González y Huarte, 2011).

### 2.6.1 Ácido salicílico

El ácido salicílico participa en muchos procesos fisiológicos de las plantas, uno de ellos es la inducción de tolerancia a factores de estrés biótico (Levine *et al.*, 1994).

Se ha descrito que en los sistemas vegetales existen tres principales fitohormonas las cuales son las responsables de varias respuestas de defensa en contra de diversos patógenos o en contra de estrés abiótico: ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Adie *et al.*, 2007).

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales participan en muchas funciones metabólicas en las plantas, como son: la síntesis de lignina, actividad alelopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas. El AS también participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento y respiración celular, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Humphreys y Chapple, 2002; Vlot *et al.*, 2009). No obstante, en grandes concentraciones los salicilatos pueden causar severos daños a las plantas porque disminuyen el proceso fotosintético, la conductividad estomática y la transpiración, lo que ocasiona estrés (Janda *et al.*, 2000).

### **2.6.2 Efecto del ácido salicílico en la erradicación de virus.**

White (1979), reportó por primera vez la participación del AS en la resistencia a enfermedades y observó la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis, conocidas también como proteínas PR, las cuales son un grupo heterogéneo de proteínas que se inducen en plantas por la infección de un patógeno. De manera paralela a la producción de proteínas PR, observó un aumento en la resistencia contra la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV), la cual se manifestó por una reducción del 90% en el número de lesiones en el tejido analizado. En la actualidad se ha reportado que en muchas plantas el tratamiento con AS o compuestos afines induce la expresión de genes PR y/o resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Vlot *et al.*, 2009). Por su parte López-Delgado *et al.* (2004), reportaron que el AS induce termotolerancia en microplantas de papa para eliminar el virus X. La supervivencia a 42°C incrementó hasta un 40% en microplantas tratadas con AS con respecto a las no tratadas. El AS también mejoró la supervivencia en el subcultivo posterior a la termoterapia, e incrementó el número de plantas libres de virus a un 100% comparado con 40 a 65 % en los testigos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La zona sur del Estado de México, cuenta con las condiciones climáticas y ecológicas que requieren los cultivos de flor de corte, en Villa Guerrero se producen varias especies; el crisantemo (*Dendratema grandiflora*) es uno de los cultivos más importantes y parte fundamental de la economía para los productores del área, sin embargo, las necesidades alimenticias de los pueblos, que crecen día con día, han llevado a cambios continuos en las prácticas culturales, que incluye variedades que dan un mayor rendimiento pero, muchas veces estas variedades son altamente susceptibles a enfermedades y factores ambientales, lo cual ha llevado al incremento del uso de agroquímicos con lo que se provocan los elevados costos de producción, contaminación al ambiente y empobrecimiento de los suelos.

Actualmente se ha observado que la gravedad de una enfermedad dada, se ve incrementada por los factores ambientales y por la sinergia de varias enfermedades ocasionadas por diversos organismos (virus, bacterias, fitoplasmas, etc.), que en un momento alguna o algunas de ellas estuvieron enmascaradas o asintomáticas, esto hace más difícil el control para una determinada enfermedad.

El establecimiento y mantenimiento de bancos de plantas madre de crisantemo requiere de material vigoroso y con condiciones fitosanitarias adecuadas.

En especies propagadas vegetativamente como es el caso del crisantemo la principal fuente de virus es la infección crónica de las mismas plantas. En estas especies las plantas infectadas con virus producen descendencia igualmente enferma que aumentan en cada multiplicación. En dichos cultivos una de las formas más exitosas de control involucra el desarrollo de clones libres de virus ya que muchos de ellos son específicos para cada especie y en ocasiones permanecen asintomáticos, lo que actualmente genera un descontrol una vez que están en las plantas.

Las enfermedades de origen viral son solo algunas de las causas de pérdidas económicas en la producción agrícola mundial al reducir los rendimientos en diferentes proporciones; en muchos casos, a pesar de no ser observados los síntomas clásicos de una infección, causan perdidas en la cosecha final. Por lo anterior, el principal problema

que limita la producción del cultivo de crisantemo es la falta de semilla agronómica certificada.

El método más eficaz y económicamente viable para obtener plantas sanas es el cultivo *in vitro*, que permite realizar técnicas para la limpieza de virus como la termoterapia, quimioterapia, cultivo de meristemos etc., o la combinación de estas para la erradicación de virus, mejorando la calidad del cultivo en todos sus aspectos, además, el cultivo *in vitro* permite la propagación múltiple de clones con las características agronómicas deseables y libres de virus. La obtención de plantas libres de virus es una práctica útil para mejorar el rendimiento de los cultivos, además la obtención de semilla (agronómica) sana podría significar menor uso de agroquímicos e insumos con impacto económico y ambiental. Actualmente la verificación de virus en una planta depende de varios factores como puede ser; la forma de detección que puede verse alterada por la concentración de virus y la parte de la planta muestreada. Por lo que es necesario además de la técnica de DAS-ELISA confirmar la presencia o ausencia de virus con otras técnicas como plantas indicadoras.

La propuesta de esta investigación, fue iniciar trabajos para la erradicación de los virus TSWV y TAV del crisantemo, empleando pretratamiento de ácido salicílico como molécula que induzca tolerancia a temperaturas altas en la termoterapia *in vitro*, para tratar de generar mayor porcentaje de plantas sobrevivientes a las temperaturas extremas y que exista mayor probabilidad de obtener plantas libre de virus.

## 4. HIPÓTESIS

El ácido salicílico induce tolerancia a temperaturas altas en plantas, lo cual puede contribuir junto con el cultivo de yemas en condiciones *in vitro* y la termoterapia, a la erradicación de los virus TSWV y TAV en el cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Erradicar los virus TSWV y TAV empleando ácido salicílico y termoterapia *in vitro* en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la respuesta de las plantas de crisantemo a la termoterapia *in vitro* y cultivo de yemas para obtener plantas libres a los virus TWSV y TAV.
2. Evaluar el efecto del ácido salicílico (AS) en la tolerancia a la termoterapia *in vitro* y para la erradicación de los virus TSWV y TAV.
3. Verificar la presencia o ausencia de los virus TSWV y TAV por la técnica DAS-ELISA contra la de Indexación.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en el KM 1.5 de la carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México, en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal y en un invernadero no tecnificado ubicado dentro de la misma institución, durante el periodo de noviembre de 2012 a diciembre de 2013. La región de Tenancingo presenta un clima CW (templado con lluvias en verano) y se encuentra a una altitud de 2020 msnm, con una latitud N 18° 57' 5" y latitud O 98° 35' 45.

### 6.1 Material biológico

Microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white fueron obtenidas del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), SEDAGRO Metepec, Estado de México, estas fueron analizadas con la prueba DAS-ELISA y plantas indicadoras a los virus *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) y *Chrysanthemum Aspermy Cucumovirus* (TAV).

Las plantas indicadoras se obtuvieron de semillas de: *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var *Xanthi* L., *Nicotiana tabacum* L. var. *Burley*, *Nicotiana rustica*, *Lycopersicon esculentum* variedad Cid., las cuales fueron empleadas para la indexación de virus (De la Torre *et al.*, 2002; Morales-Díaz *et al.*, 2008).

### 6.2 Medio de cultivo

El medio básico (MS) se preparó con sales inorgánicas del medio MS (Medio Murashige y Skoog, 1962; modificado por Espinoza *et al.*, 1986), adicionando cantidades por litro de: sales, sulfato de magnesio (Mg SO<sub>4</sub>), mio-inositol, hierro (Fe), tiamina, pantotenato de calcio, glicina y azúcar, posteriormente se aforó con agua destilada (H<sub>2</sub>O) y se ajustó el pH a 5.6-5.7 con hidróxido de potasio (KOH). Después se agregó el agar y se disolvió

con calor (Anexo 1). Se utilizaron frascos “gerber®” con 20 mL y tubos de 13X100 mm con 4.5 mL de medio.

### **6.3 Solución de ácido salicílico (AS)**

Se hizo una solución madre de 20 mg de AS en 50 mL de H<sub>2</sub>O. El AS se disolvió en 0.5 mL de KOH 1N y posteriormente se aforó con H<sub>2</sub>O destilada a 50 mL. Después se agregó la concentración requerida al medio y se ajustó el pH a 5.6-5.7.

El instrumental de laboratorio usado en la micropropagación (cajas petri, pinzas, bisturí, algodón) y medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos en una autoclave (Felisa®) a una presión de 15 lb.cm<sup>2</sup>, a 120°C.

### **6.4 Siembra *in vitro***

La propagación de las microplantas se realizó en una campana de flujo laminar horizontal previamente esterilizada. Se consideraron yemas de aproximadamente 1 mm que fueron incluidas a medio MS colocadas verticalmente esparcidas en el frasco o en tubos, revisando semanalmente la supervivencia de las yemas, realizando labores de mantenimiento, eliminando aquellas que estaban oxidadas y/o contaminadas.

### **6.5 Condiciones *in vitro***

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas a una temperatura de 20±1°C y una radiación de ca 35 μmol m<sup>2</sup> seg<sup>-1</sup>, 400-700 nm.

### **6.6 Condiciones de termoterapia**

Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento (Mod. 845 Thermo Scientific.) con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 37, 37.5 y 38°C.

## 6.7 Condiciones de Invernadero

Invernadero no tecnificado, con una temperatura oscilante entre 25-35°C y con un 60-70% de humedad relativa.

## 6.8 Descripción de los experimentos

### 6.8.1 Verificación del material vegetal positivo y/o negativo a los virus TSWV y TAV por la técnica DAS-ELISA contra la de Indexación.

La sabia de microplantas de crisantemo se analizó mediante la técnica de DAS-ELISA y plantas indicadoras.

### 6.8.2 Efecto del AS en la termotolerancia *in vitro* de microplantas libres de virus

Se utilizaron yemas axilares de crisantemo negativas (-) a TSWV y TAV se subcultivaron en medio MS (cultivo básico Murashige y Skoog, 1962 modificado por Espinoza *et al.*, 1986), en 0 y  $10^{-5}$  M de AS, después de 28 días se subcultivaron en tubos con 4.5 mL de medio MS, y permanecieron por 5 días en condiciones *in vitro* (López-Delgado *et al.*, 2004). Posteriormente las microplantas se expusieron a 37, 37.5 o 38°C por 25 días en la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

### 6.8.3 Efecto del AS en la termotolerancia *in vitro* de microplantas positivas a los virus TSWV y/o TAV

Se utilizaron yemas axilares de crisantemo positivas (+) y negativas (-) a TSWV, TAV y a ambos virus, se subcultivaron en medio MS en 0 y  $10^{-5}$  M de AS, después de 28 días se subcultivaron en tubos con 4.5 mL de medio MS, y permanecieron por 5 días en condiciones *in vitro*. Posteriormente las microplantas se expusieron a 37°C por 30 días en la cámara de crecimiento (López-Delgado *et al.*, 2004). Las microplantas obtenidas después de la termoterapia fueron esquejeadas y cultivadas en medio MS por 28 días. Al finalizar se analizaron con la prueba DAS-ELISA y plantas indicadoras.

## 6.9 Técnicas de diagnóstico

Las técnicas utilizadas para determinar la presencia o ausencia de virus fueron dos DAS–ELISA (Sánchez, 2012) y plantas indicadoras (Salas *et al.*, 1972; Jayasinghe y Chuquillanqui, 1992; De la Torre *et al.*, 2002; Valenzuela-Herrera y Redondo-Juárez, 2002; González *et al.*, 2002 y Morales-Díaz *et al.*, 2008).

### 6.9.1 Técnica de plantas indicadoras

#### Germinación y crecimiento de las plantas indicadoras

Para su germinación las semillas de *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var *Xanthi* L., *Nicotiana tabacum* L. var. *Burley*, *Nicotiana rustica*, *Lycopersicon esculentum* se sembraron en una charola con sustrato “peat moss” y agrolita relación (2:1). Se estableció un control de insectos mediante jaulas con malla antiafidos, 30 días después de la siembra, las plántulas en estado de desarrollo vegetativo se trasplantaron a una maceta utilizando una mezcla de sustrato peat moss, agrolita y humus de lombriz de relación (2:1:1). Los riegos se realizaron tres veces por semana con tres fertilizaciones; una con fertilizante 18-46-00 fosfato di amónico (DAP), triple 20 (20-20-20) y 11-52-00 fosfato mono amónico (MAP).

#### Inoculación de plantas indicadoras

Un gramo de tejido de planta de crisantemo variedad *Polaris white* de 30 días antes y después de la termoterapia, fue macerado en una bolsa con 2 mL de la solución amortiguadora de fosfatos de sodio (Baker) 0.050 M y un pH 7.0.

Se agregaron 20 µL de savia en las hojas previamente frotadas con el abrasivo con silicón carbide (Sigma).

Como testigo se utilizaron plantas sanas de tabaco y jitomate frotadas con silicón carbide y solución amortiguadora de fosfatos.

Cada cinco días se monitoreo la aparición de síntomas en las plantas inoculadas, se verificó la presencia de manchas cloróticas y necróticas; 30 días después de la

inoculación se midieron las unidades SPAD de las hojas inoculadas, las unidades SPAD determinan la cantidad relativa de clorofila presente mediante la medición de la absorción de la hoja en dos regiones de longitud de onda; en las regiones roja y cercanas a infrarojo. Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. En jitomate a los 20 días después de la inoculación se midió la altura de las plantas. Las variables evaluadas en la sintomatología fueron las indicadas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Síntomas evaluados en plantas indicadoras *Nicotiana tabacum* L. var *Xanthi*, *Nicotiana rustica*, y *Lycopersicon esculentum*.

Síntoma	Medición
<b>Clorosis</b>	Unidades SPAD (Konica minolta Chlorophyll meter spad 502Plus)
<b>GRADO</b>	
<b>Severa</b>	
<b>Media</b>	
<b>Leve</b>	
<b>Nula</b>	Observación
<b>Mosaico</b>	Si No
<b>Abultamiento severo en hojas</b>	Observación
	Si No
<b>Deformación</b>	Observación
	Si No
<b>Anillos cloróticos</b>	Observación
	Si No
<b>Anillos necróticos</b>	Observación
	Si No
<b>Marchitez</b>	Observación
	Si No
<b>Lesiones locales cloróticas</b>	Observación
	Si No
<b>Lesiones locales necróticas</b>	Observación
	Si No
<b>Necrosis</b>	Observación
	Si No
<b>Distorsión apical</b>	Observación
	Si No
<b>% de inhibición en crecimiento</b>	cm

## 6.9.2 Prueba de DAS-ELISA

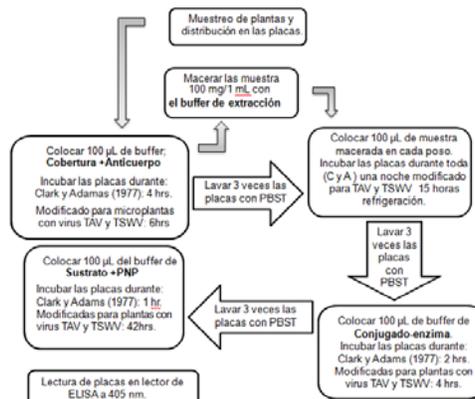
Se utilizó la prueba serológica de doble anticuerpo ligado a enzimas (DAS-ELISA), para verificar la presencia de los virus TSWV y TAV (Clark y Adams, 1977 modificada por Sánchez, 2012). Se utilizaron antisueros específicos comerciales Agdia® para la detección de los virus TSWV, TAV y TSWV-TAV a una dilución de 1:200 para ambos virus.

Protocolo de DAS-ELISA, modificado para microplantas de crisantemo (Sánchez, 2012):

- 1.- Incubación de placas con buffer de cobertura + anticuerpo.
- 2.- Maceración de las muestras con buffer de extracción e incubación de placas.
- 3.- Incubación de las placas con buffer ECI de conjugado + enzima, en cada paso de incubación las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado; PVS-Tween.
- 4.- Incubación de las placas con buffer de sustrato + PNP para el revelado, la lectura de la placa fue evaluada después del último paso a los 30 y 60 minutos midiendo la absorbancia de 405 nm en un microlector (Stat Fax® 2100 Microplate Reade).

Se incluyeron controles positivos y negativos comerciales Agdia® para cada uno de los virus a detectar.

Se realizaron dos repeticiones en cada caso y como controles negativos y positivos específicos comerciales Agdia® al TSWV y al TAV (Figura 1; Anexo 2).



**Figura 1.** Sistematización de técnica DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) con modificación para microplantas de *D. grandiflora* variedad Polaris white para los virus TSWV y TAV (Sánchez, 2012).

**Las variables evaluadas fueron:**

La presencia y ausencia de virus se verificó antes y después de la termoterapia, absorbancia en nm para DAS-ELISA y síntomas expresados en plantas indicadoras.

Durante la termoterapia, se evaluó solo la supervivencia de microplantas (turgencia y brote verde).

El diseño experimental fue de bloques al azar con 40 plantas por tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ( $P \leq 0.05$ ) y Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Verificación del material vegetal positivo y/o negativo a los virus TSWV y TAV

De la verificación de virus en microplantas de crisantemo mediante la prueba de DAS-ELISA y plantas indicadoras (indexación), se obtuvo: 40% positivas a los 2 virus (TSWV-TAV), 20% positivas a TSWV, 20% positivas a TAV y 20% negativas a los dos virus (Cuadro 2). Se obtuvieron los mismos resultados en las dos pruebas, es posible que no se observaran diferencias en los resultados de la verificación de los virus en ambas técnicas por que se evaluó toda la microplanta. Al respecto Kelaniyangoda y Madhubashini (2008), mencionan que es posible que haya diferencia en la verificación de virus en cada técnica, y se debe de tomar en cuenta el tipo de virus a analizar, debido a que algunos presentan movimiento sistémico y lo recomendable es analizar toda la planta incluyendo las raíces para así obtener datos más confiables.

Ocampo *et al.* (2013), utilizó para la liberación de una nueva variedad de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) tres pruebas para la detección de virus DAS-ELISA, RT-PCR y plantas indicadoras a los virus *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), obteniendo resultados similares en las tres pruebas, ya que una sola prueba no siempre es suficiente para la detección de virus. Para efectos de este trabajo se obtuvieron datos similares en las dos pruebas utilizadas en microplantas de crisantemo. Se tienen reportes que indican que la prueba de DAS-ELISA para la detección de virus puede tener cierto margen de error principalmente si la concentración del virus es baja, por lo que se recomienda como prueba más eficaz el uso de plantas indicadoras para asegurar la presencia o ausencia de los virus (Ram *et al.*, 2007). Cada método de detección de virus posee ventajas y desventajas por lo que en la mayoría de los casos es necesario utilizar más de uno de ellos para la detección de virus (De Blas *et al.*, 1996).

La detección de virus generalmente ha sido reportada para plantas de invernadero y de campo (Espinoza, 2012), en este trabajo se utilizaron plantas en condiciones *in vitro*, por lo que se hicieron adecuaciones a las técnicas de detección. La optimización de

DAS-ELISA, fue realizada en un trabajo previo del mismo proyecto (Sánchez, 2012, [PROMEPA/103.5/09/4195](#)), y en este trabajo se adecuó principalmente la indexación.

**Cuadro 2.** Resultados de la verificación de los virus TSWV y/o TAV mediante la prueba DAS-ELISA y plantas indicadoras.

Material biológico	% por la prueba de DAS-ELISA*	% por indexación
Negativa a los 2 virus	20	20
Positiva TSWV	20	20
Positiva TAV	20	20
Positiva TSWV/TAV	40	40

\*La prueba de DAS-ELISA se consideró negativa cuando las 2 repeticiones mostraron negativos los resultados.

### 7.1.1 Resultados de la optimización de la técnica de indexación a los virus TSWV y TAV

Para este trabajo, se adecuó la indexación de los virus TSWV y TAV en plantas indicadoras, basándose en las técnicas propuestas por: Salas *et al.* (1972), Jayasinghe y Chuquillanqui (1992), De la Torre *et al.* (2002), Valenzuela-Herrera y Redondo-Juárez (2002), González *et al.* (2002) y Morales-Díaz *et al.* (2008).

Las plantas indicadoras utilizadas fueron; *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* L. var *Xanthi* y *Lycopersicon esculentum*, y para la adaptación de la técnica se consideró; la cantidad de buffer adicionado al tejido, la cantidad de muestra para inocular, la cantidad y forma de aplicación del abrasivo (silicón carbide), el tamaño de la herida, el manejo del cultivo (fertilización, riego, prevención de plagas y enfermedades), y los síntomas evaluados.

Las adaptaciones a la técnica de indexación para detectar los virus TSWV y TAV presentes en microplantas de crisantemo variedad *Polaris white*, fueron:

- En la germinación de semillas de las plantas indicadoras, se utilizó como sustrato “peat moss” y agrolita en relación (2:1). En el trasplante se realizó una mezcla de “peat moss”, agrolita y humus de lombriz en relación (2:1:1).
- Se estableció un control de insectos mediante jaulas con malla antiafidos (previamente desinfectadas con alcohol 96%).
- Los riegos se realizaron tres veces por semana y se hicieron tres fertilizaciones durante el ciclo (18-46-00 fosfato di amónico (DAP), 20-20-20 (triple 20) y 11-52-00 fosfato mono amónico (MAP).
- Para la obtención de savia, se utilizó 1 gramo de tejido de planta de 30 días de edad, el cual fue macerado en una bolsa con 2 mL de la solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.050 M a pH 7.0.
- Para la inoculación, el tamaño de la herida se optimizó para la visualización de los síntomas en cada especie debido a que las hojas de jitomate eran más pequeñas que las de los tabacos, siendo: para las *Nicotianas* de 10.00 mm y para *Lycopersicon esculentum* de 7.8 mm aproximadamente. La herida se realizó, frotando la hoja con silicón carbide y después se le agregó 20 µL de savia, en el control se agregaron 20 µL de amortiguador.
- Para la valoración de síntomas se midieron las unidades SPAD para indicar el grado de clorosis de las plantas. Entre los procesos más afectados por los virus está la fotosíntesis. Varios virus interfieren en esta actividad mediante disminución de pigmentos o de componentes proteicos del fotosistema II (Matthews, 1991; González *et al.*, 1997), o bien, reducen la superficie foliar y/o modifican la disposición de las hojas.

Los síntomas esperados por la inoculación de plantas indicadoras fueron; clorosis (unidades SPAD), mosaico, anillos cloróticos y necróticos, marchitez, lesiones locales cloróticas y necróticas, necrosis y porcentaje de inhibición en el crecimiento; si las plantas expresaban al menos un síntoma se tomaban como positivas. Los primeros síntomas aparecieron entre los siete a diez días en las tres especies de plantas indicadoras utilizadas. La aparición de síntomas en las plantas indicadoras va a

depender del tipo de virus y las condiciones ambientales presentes; antes, durante y después de la inoculación que son indispensables para que se ocurra la transmisión, infección y manifestación de los síntomas (Kelaniyangoda y Madhubashini, 2008).

## **7.1.2 EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS EN PLANTAS INDICADORAS**

### **7.1.2.1 Expresión de síntomas en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) por inoculación de los virus, TSWV, TAV y TSWV-TAV.**

#### **7.1.2.1.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en jitomate**

Las plantas de jitomate inoculadas con el virus TSW, mostraron una severa inhibición del crecimiento hasta en un 48.1% con respecto al testigo (Cuadro 3, Figura 2). Datos similares fueron encontrados en la inoculación mecánica de TSWV sobre *Lycopersicon hirsutum*, además de clorosis (Soler *et al.*, 1998; Morales-Díaz *et al.*, 2008).

La manifestación del síntoma de mosaico en plantas de jitomate inoculadas con el virus TSW tardó aproximadamente 20 días en aparecer, además, presentó disminución del área foliar (datos no mostrados), aunque, De la Torre *et al.* (2002), reportaron que en inoculaciones de TSWV en jitomate la expresión de síntomas fueron: mosaico, oscurecimiento de hojas y mancha anular necrótica, y que el síntoma de mosaico se expresa en los primeros días después de la inoculación. Esto demuestra que la aparición de síntomas no está totalmente ligado a la especie o variedad, ya que estos autores utilizaron también *L. sculentum*, pero ellos realizaron la inoculación en los fotoperiodos correspondientes a las estaciones de primavera y verano. Por lo que posiblemente la diferencia en el tiempo de aparición de los síntomas se deba a las condiciones climáticas, ya que las inoculaciones de TSWV y TAV se realizaron en los fotoperiodos correspondientes a la estación de otoño y en invernadero no tecnificado.

**Cuadro 3.** Síntomas expresados en jitomate por la inoculación mecánica del TSWV, TAV y TSW-TAV presentes en crisantemo.

Síntoma		Expresión del síntoma			
		Testigo	+	+	+
			TSWV	TAV	TSWV-TAV
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	14.5-21	Nula	Media	Leve	Media
<b>Media</b>	22-29	(41.55)	(23.65)	(32.40)	(27.40)
<b>Leve</b>	30-36				
<b>Nula</b>	≤37				
<b>Mosaico</b>		No	Si	No	Si
<b>Anillos cloróticos</b>		No	No	No	No
<b>Anillos necróticos</b>		No	No	No	No
<b>Marchitez</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	Si	Si	Si
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	Si	Si	Si
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No
<b>% de inhibición en el crecimiento</b>		0	48.14	50	42.59

+ positiva.



**Figura 2.** Efecto de la inoculación mecánica del virus TSW en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

#### 7.1.2.1.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en jitomate

Se tienen reportes de que el TAV generalmente infecta de forma local cuando se inocula sobre plantas indicadoras (Jones, 2000). En este trabajo la inoculación del TAV en jitomate mostró síntomas sistémicos porque disminuyó el crecimiento en un 50% con respecto al testigo, además de mostrar, lesiones locales cloróticas y necróticas (Cuadro 3, Figura 3).



**Figura 3.** Efecto de la inoculación mecánica del TAV en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

#### 7.1.2.1.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en jitomate

El TAV es un virus asintomático que generalmente se expresa cuando existen otros virus (Brierley, 1955; en Aquino, 2005). Por lo que cuando se inoculo con TSWV (TAV-TSWV) en jitomate expresó síntomas locales y sistémicos; redujo el crecimiento un 42.5% respecto al testigo (Cuadro 3, Figura 4), además, mostró lesiones locales necróticas y con clorosis media (27.40 unidades SPAD; Cuadro 3). La presencia de los dos virus en las microplantas pudo expresarse en síntomas sistémicos ya que el TSWV es sistémico y sintomático en esta región florícola (zona Sur del Estado de México).



**Figura 4.** Inhibición del crecimiento por la inoculación de TSWV-TAV en jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

#### 7.1.2.2 Expresión de síntomas en plantas de *Nicotiana rustica* por inoculación de los virus, TSWV, TAV y TSWV-TAV

##### 7.1.2.2.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en *N. rustica*

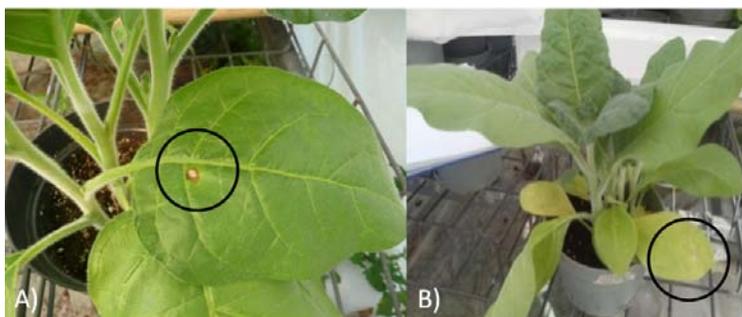
Los síntomas expresados por la inoculación del TSWV fueron: manchas necróticas y cloróticas no solo en la hoja inoculada sino en varias hojas de la planta (infección sistémica) y clorosis hasta llegar a la marchitez; cabe mencionar que los valores para determinar el grado de clorosis fue diferente en cada especie indicadora, debido a que cada una de ellas presenta tonalidades de verde diferente (Cuadro 4, Figura 5-A). Los síntomas expresados del TSWV sobre *N. rustica* son principalmente debidos a que este virus infecta sistémica y localmente (Jones, 2000). De la Torre *et al.* (2002), reportaron que la inoculación de TSWV en *N. rustica*, mostró mancha necrótica, lesiones locales cloróticas, hasta llegar a la marchitez; lo que confirma los síntomas expresados por la inoculación de este virus sobre *N. rustica*.

**Cuadro 4.** Síntomas expresados en *N. rustica* por la inoculación mecánica del TSWV, TAV y TSWV-TAV presentes en crisantemo.

Síntoma		Expresión del síntoma			
		Testigo	+	+	+
			TSWV	TAV	TSWV-TAV
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	3.8-10	Nula	Media	Severa	Media
<b>Media</b>	11-17	(26.99)	(11.82)	(8.49)	(12.51)
<b>Leve</b>	18-24				
<b>Nula</b>	≤25				
<b>Mosaico</b>		No	No	No	No
<b>Anillos cloróticos</b>		No	Si	Si	Si
<b>Anillos necróticos</b>		No	Si	Si	Si
<b>Marchitez</b>		No	Si	No	Si
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	Si	Si	Si
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	Si	No	Si
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No

+ positiva.

El TSWV ha sido evaluado sobre *N. rustica* por Morales-Díaz *et al.* (2008), mostrando síntomas como; lesiones locales cloróticas, lesiones locales necróticas, anillos necróticos y marchitez; síntomas también encontrados en este trabajo (Figura 5-B).



**Figura 5.** A) Anillos cloróticos causados en hoja del estrato medio y B) clorosis basal causada por la inoculación del virus TSW sobre *Nicotiana rustica*.

#### 7.1.2.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en *N. rustica*

La inoculación del virus aspermia del crisantemo sobre *Nicotiana rustica* mostró una severa clorosis, lesiones locales cloróticas (Figura 6-A) y necróticas respecto al testigo (Figura 6-B) y no se expresó de forma sistémica, se ha reportado al respecto que el TAV es un virus asintomático en las plantas hospederas, sin embargo, puede llegar a expresar síntomas (Jones, 2000).

Es posible que el TAV solo exprese síntomas locales en *N. rustica* dependiendo de los factores en que se encuentre, dentro de los que cabe mencionar la especie utilizada y la asociación con otro virus, ya que en jitomate si expresó síntomas en forma sistémica. Es muy importante entonces, considerar el huésped donde se hará la indexación ya que el problema radica cuando el TAV no se expresa. Rosales *et al.* (2011), mencionan que las infecciones asintomáticas, enmascaran los resultados en el control de las enfermedades causadas por virus, por que actúan como fuente de inóculo para cultivos sanos.

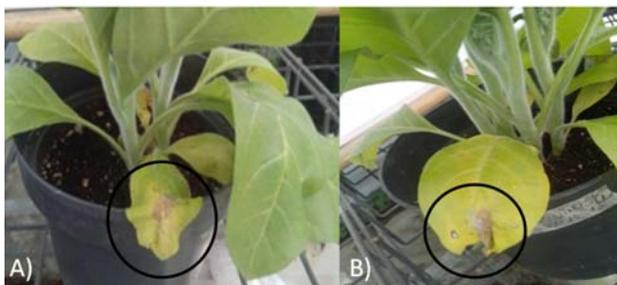


**Figura 6.** A) Lesiones cloróticas y B) lesiones necróticas causadas por la inoculación del TAV sobre *Nicotiana rustica*.

#### 7.1.2.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en *N. rustica*

El daño por la interacción de dos o más virus puede verse más severo que si se encuentra solo uno; el TAV se expresa cuando existen otros virus (Brierley, 1955; en Aquino, 2005). En este trabajo el TAV mostró cuatro síntomas que fueron; clorosis, lesiones locales cloróticas, anillos cloróticos y necróticos (Figura 6) y la interacción del

TAV-TSWV expresó siete: clorosis, anillos cloróticos y necróticos, lesiones locales cloróticas y necróticas y marchitez (Figura 7). En este trabajo se confirmó que la infección de TAV se expresó en la planta cuando estuvo presente el TSWV.



**Figura 7.** A) Marchitez y B) anillos necróticos expresados por la inoculación de TSWV-TAV sobre *Nicotiana rustica*.

### 7.1.2.3 Expresión de síntomas en plantas de *Nicotiana tabacum* L. var Xanthi por inoculación de los virus, TSWV, TAV y TSWV-TAV

#### 7.1.2.3.1 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV en *N. tabacum*

Los síntomas de la inoculación del virus TSW en plantas de *Nicotiana tabacum* fueron; manchas necróticas solo en la hoja infectada, mosaico, anillos cloróticos y clorosis (Cuadro 5, Figura 8) mismos síntomas reportados por De la torre *et al.* (2002).



**Figura 8.** Manchas necróticas y clorosis severa causadas por la inoculación de TSWV sobre *Nicotiana tabacum*.

**Cuadro 5.** Síntomas expresados en *N. tabacum* por la inoculación mecánica del TSWV, TAV y TSWV-TAV presentes en crisantemo.

Síntoma	Expresión del síntoma				
	Testigo	+	+	+	
		TSWV	TAV	TSWV-TAV	
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	0-4	Leve	Media	Leve	Severa
<b>Media</b>	5-9	(14.56)	(9.88)	(10.33)	(4.60)
<b>Leve</b>	10-13				
<b>Nula</b>	≤13				
<b>Mosaico</b>		No	Si	Si	Si
<b>Anillos cloróticos</b>		No	Si	Si	Si
<b>Anillos necróticos</b>		No	Si	Si	Si
<b>Marchitez</b>		No	Si	Si	Si
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	Si	Si	Si
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	Si	Si	Si
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No

+ positiva.

#### 7.1.2.3.2 Síntomas expresados por la inoculación de TAV en *N. tabacum*

La reacción de virus específicos en plantas indicadoras puede estar dada por diversos factores como la técnica de inoculación y condiciones de incubación (Hiruki, 1975). En *N. tabacum* se encontró que tanto el testigo como plantas indexadas con TSWV, TAV y TSWV-TAV mostraron clorosis (Cuadro 5, Figura 9). Para este caso la clorosis no es un síntoma determinante importante para indicar presencia de virus debido a que la planta en condiciones normales es más clorótica que *Nicotiana rustica* y *Lycopersicon sculentum*.

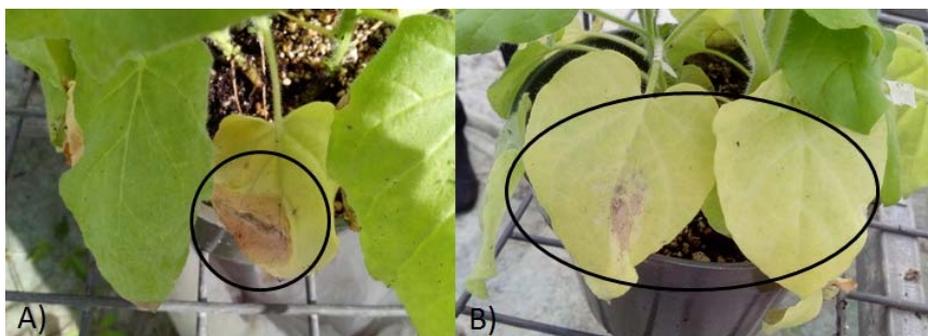


**Figura 9.** Clorosis causada por la inoculación de TAV sobre *Nicotiana tabacum*.

#### 7.1.2.3.3 Síntomas expresados por la inoculación de TSWV-TAV en *N. tabacum*

El TSWV por si solo causa típicamente manchas en forma de anillos concéntricos en la mayoría de sus hospedantes susceptibles, pero es común que también cause mosaicos, necrosis de tallos, pecíolos y flores, así como enanismo (Morales-Días *et al.*, 2008). Cuando se inoculó el TSWV sobre *N. tabacum* presentó clorosis media y cuando estuvo combinado con el TAV la clorosis fue severa (Cuadro 5).

La presencia de manchas necróticas se expresó en la misma intensidad tanto en la inoculación del virus TSWV como con TSWV-TAV (Figura 10-A). Por esta razón se considera que el virus TAV no provoca daños visibles a la planta, más bien es un virus que permanece asintomático y causa daño al asociarse a otros virus, el daño que causó el TAV a las microplantas de crisantemo en combinación con el virus TSWV fueron los mismos síntomas pero estos incrementaron la severidad; siendo en el TAV una clorosis leve de 10.33 unidades SPAD y en combinación con el TSWV una clorosis severa de 4.60 unidades SPAD (Cuadro 5, Figura 10-B).



**Figura 10.** A) Manchas necróticas y B) clorosis severa causada por la inoculación de TSWV-TAV sobre *Nicotiana tabacum*.

## 7.2 Efecto del AS en la termotolerancia *in vitro* de microplantas libres de virus

La utilización de termoterapia y cultivo de meristemos (*in vitro*) se han utilizado para la eliminación de virus y viroides en crisantemo, incrementando el porcentaje de plantas libres (Ammirato *et al.*, 1990), sin embargo, una desventaja de aplicar termoterapia por tiempos prolongados es que muchas de las plantas que se obtienen presentan clorosis en los tallos y hojas quebradizas (hiper-hidratación) y posteriormente muerte. La termoterapia *in vitro* puede incrementar la concentración de sales en el medio de cultivo, y disminuir la humedad, por lo que se afecta el potencial hídrico y el balance hormonal, provocando un estrés excesivo (Majada *et al.*, 2002). Para mitigar el efecto de la temperatura en la erradicación de virus, en este trabajo se utilizó un pretratamiento *in vitro* por cuatro semanas con 0 y  $10^{-5}$  M de ácido salicílico (López *et al.*, 2004), en plantas de crisantemo.

Las microplantas se expusieron a las temperaturas de 37, 37.5 o 38°C por 25 días. Las microplantas pretratadas con AS incrementaron la supervivencia en las tres temperaturas probadas, con respecto a las microplantas no pretratadas con AS (control). Las microplantas pretratadas con AS sometidas a 38°C incrementaron hasta un 6.6% más la supervivencia que el testigo, pero solo sobrevivieron 10 días; las expuestas a 37.5°C un 4.5% y a 37°C un 20% (Cuadro 6). La termoterapia presenta un estrés excesivo, que daña e inclusive ocasiona la muerte a la planta, como se observó

en este caso para las microplantas de crisantemo variedad Polaris white expuestas a más de 37°C.

La supervivencia en microplantas pretratadas con 10<sup>-5</sup> M de AS y expuestas a 37°C incrementó significativamente con respecto al testigo (Cuadro 6). Al respecto Humphreys y Chapple (2002) y Vlot *et al.* (2009), mencionan que el ácido salicílico participa en repuestas de tolerancia a estrés abiótico como el exceso de temperatura, respuesta encontrada en la termoterapia a 42°C con 10<sup>-5</sup> de AS utilizada para la erradicación de virus en papa (López-Delgado *et al.*, 2004).

**Cuadro 6.** Efecto del tratamiento de ácido salicílico sobre microplantas de crisantemo libres de los virus TSWV y TAV, sometidas a termoterapia.

Temperatura °C [AS] M	Tratamiento	% de supervivencia	
		10 días de tratamiento	25 días de tratamiento
38	0	60.00 <sup>a</sup>	
	10 <sup>-5</sup>	66.67 <sup>b</sup>	
37.5	0	81.82	13.64 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	95.45	18.18 <sup>b</sup>
37	0	94.12	25.00 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup>	100.00	45.00 <sup>b</sup>

Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (Tukey,  $P < 0.005$ ).

Si bien los métodos de erradicación de virus han permitido la obtención de plantas libres de virus, se han detectado especies menos tolerantes al tratamiento térmico, los cuales afectan de forma negativa la supervivencia de las plantas tratadas y dificultan la obtención de plantas libres de virus (Sánchez *et al.*, 1991), la exposición de microplantas de crisantemo en condiciones *in vitro* a 38°C no sobrevivieron por más de 10 días, resultando ser el crisantemo menos tolerante a las temperaturas altas en comparación con otras plantas como la papa que en condiciones *in vitro* tolera hasta 42°C (López-Delgado *et al.*, 2004).

De los resultados obtenidos se observó que para el crisantemo variedad Polaris white la temperatura más alta que resistió en condiciones *in vitro* fue de 37°C ya que sobrevivieron por más de 25 días mientras que a 38°C solo 10. Trabajos realizados con termoterapia en crisantemo han probado temperaturas entre 35-40°C por cuatro a cinco semanas para obtener tejidos libres de virus, por encima de este último valor los porcentajes de sobrevivencia son bajos, cabe mencionar que estos intervalos de temperatura no son en condiciones *in vitro* sino de plantas en invernadero. De acuerdo a esto la temperatura que se debe emplear en la termoterapia va a depender de varios factores como; tipo de virus, variedad, edad, tiempo de exposición y condiciones de desarrollo y crecimiento ya sea en *in vitro* o invernadero, entre otros (Anmirato *et al.*, 1990; Razdan, 2003).

### **7.3 Efecto del AS en la termotolerancia *in vitro* de microplantas positivas a los virus TSWV y/o TAV**

El problema de la erradicación de virus principalmente es debido a que no hay una técnica 100% efectiva; además cada especie vegetal requiere adecuaciones, de ahí que recientemente se hace uso de otros compuestos y alternativas para la eliminación de virus. Así, recientes estudios han encontrado que el ácido salicílico participa en las respuestas a estrés por calor, lo que en su momento contribuye en el manejo para la erradicación de virus utilizando la termoterapia (López-Delgado *et al.*, 2004; González y Huarte, 2011).

El crisantemo variedad Polaris white con presencia de virus mostró ser muy sensible al calor (Cuadro 6) con respecto a otros cultivos, como por ejemplo *Solanum tuberosum*. Trabajos recientes López-Delgado *et al.* (2004), reportaron que en microplantas de papa pretratadas con ácido salicílico positivas al PVY expuestas a 42°C por 30 días incrementaron la supervivencia hasta un 100% en algunos clones.

**Cuadro 7.** Efecto del pretratamiento de ácido salicílico sobre microplantas de crisantemo positivas a TSWV y/o TAV expuestas a 37°C.

Muestras	Tratamiento	% de supervivencia a los 25-30 días
NEGATIVA	0	50.00 <sup>a</sup>
NEGATIVA	10 <sup>-5</sup>	71.43 <sup>b</sup>
+ TAV	0	75.76 <sup>a</sup>
+ TAV	10 <sup>-5</sup>	81.82 <sup>a</sup>
+ TSWV	0	15.00 <sup>a</sup>
+ TSWV	10 <sup>-5</sup>	30.00 <sup>b</sup>
+ TSWV-TAV	0	50.00 <sup>a</sup>
+ TSWV-TAV	10 <sup>-5</sup>	60.63 <sup>b</sup>

+ positiva. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (Tukey,  $P < 0.005$ ).

Las microplantas de crisantemo variedad Polaris white negativas a TSWV, TAV y TSWV-TAV pretratadas con AS, mostraron un incremento de la supervivencia hasta en un 21.43% más que el testigo (Cuadro 7), mientras que las microplantas positivas a TSWV, TAV y TSWV-TAV pretratadas con AS, incrementaron la supervivencia hasta un 50.00, 6.06 y 10.63% respectivamente con referencia a los testigos (Cuadro 7). Aunque este incremento no fue significativo en las microplantas positivas a TAV (Cuadro 7). Es importante destacar que las microplantas infectadas con el virus TAV tuvieron mayor porcentaje de supervivencia que las microplantas infectadas con TSWV y TSWV-TAV, por lo que posiblemente este virus no afecta la supervivencia en condiciones *in vitro* como tampoco lo es en invernadero y campo.

Las microplantas pretratadas con AS y después de cuatro semanas de termoterapia, resultaron negativas a los virus TSWV y TSWV-TAV, de acuerdo a las pruebas de verificación de DAS-ELISA y plantas indicadoras (Cuadros 8 y 9).

**Cuadro 8.** Efecto del ácido salicílico en la erradicación de virus de microplantas de crisantemo, verificadas por la técnica de DAS-ELISA.

Verificación DAS-ELISA, antes de la termoterapia	Pretratamiento de AS[M]	Verificación DAS-ELISA, después de la termoterapia
Negativa	10 <sup>-5</sup>	Negativa
Negativa	0	Negativa
+ TAV	10 <sup>-5</sup>	Sin dato*
+ TAV	0	Sin dato*
+ TSWV	10 <sup>-5</sup>	Negativa
+ TSWV	0	+ TSWV
+ TSWV/TAV	10 <sup>-5</sup>	- TSWV-TAV
+ TSWV/TAV	0	Sin dato*

+ positiva. \*Datos no evaluables.

Para aumentar las posibilidades de obtener plantas libres de virus, especialmente cuando hay más de un virus presente, se someten a tratamiento con calor, y posteriormente al cultivo de meristemos (Pierik, 1987), al respecto Espinoza (2012), también menciona que la termoterapia es eficiente para eliminar la infección de un solo virus y que con la presencia de dos virus es más difícil, ya que encontró que el virus TAV presente en crisantemo fue eliminado más fácilmente que cuando se encuentra asociado con otro virus (CVB/TAV).

De acuerdo a esto la erradicación de TSWV-TAV observada en crisantemo pudo haber sido inducida por la combinación entre: el pretratamiento con AS, la termoterapia y el cultivo de meristemos (*in vitro*) y no por una sola. Situación encontrada también por Panta y Golmirzaie (1997), que reportaron que el cultivo de meristemos y la termoterapia redujeron la concentración de virus en crisantemo. Es importante destacar que la termoterapia tradicional en crisantemo, proporciona dificultad para la erradicación, debido a que solo es útil la yema apical por planta, ya que las yemas laterales son extremadamente pequeñas (Sánchez, 2012).

**Cuadro 9.** Efecto del ácido salicílico en la erradicación de virus de microplantas de crisantemo, verificadas por indexación.

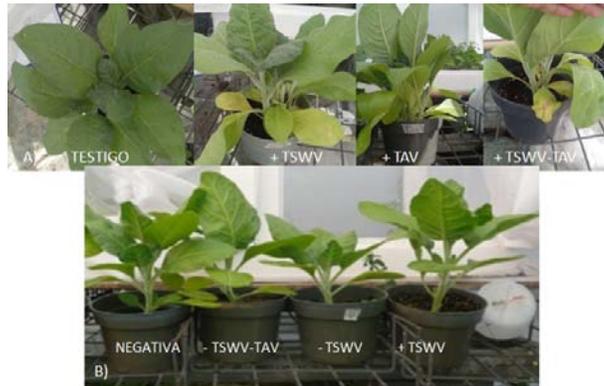
Verificación plantas indicadoras, antes de la termoterapia	Pretratamiento de AS[M]	Verificación plantas indicadoras, después de la termoterapia
+ TAV Síntomas locales	10 <sup>-5</sup>	Sin dato*
		Negativa a TSWV
+ TSWV Síntomas locales y sistémicos	10 <sup>-5</sup>	Sin síntomas †
	0	+ TSWV Sin síntomas locales y con sistémicos†
		Negativa a TSWV-TAV
+ TWV-TAV Síntomas locales y sistémicos	10 <sup>-5</sup>	Sin síntomas †
	0	Negativa a TSWV-TAV Sin síntomas †

+ positiva. †Ver anexo 3. \* Datos no evaluables.

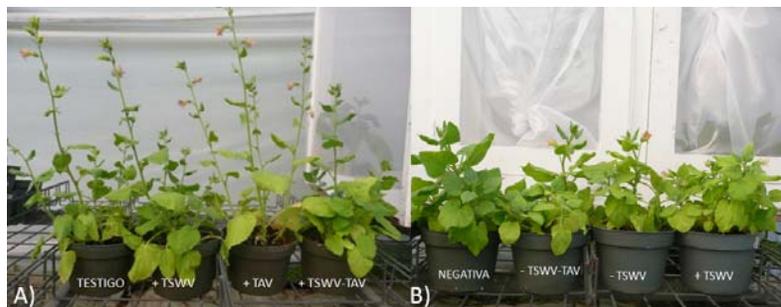
Como se mencionó anteriormente la verificación de la presencia o ausencia de virus, no solo se basa en una sola técnica para tener la confiabilidad de los resultados, por esta razón en el presente trabajo se utilizaron las plantas indicadoras para verificar la información obtenida en DAS-ELISA. Así, la inoculación de savia de plantas positivas a TSWV pretratadas con AS después de la termoterapia, sobre jitomate, no expresaron síntomas (Cuadro 10; Figura 11; Anexo 3) que indicaran la presencia del virus y en la inoculación sobre *Nicotiana rustica* y *N. tabacum* tampoco hubo expresión de los síntomas (Cuadro 11 y 12; Figura 12 y 13; Anexo 3), por lo que se asume que el virus TSWV y la combinación TSWV-TAV en microplantas de crisantemo variedad Polaris white se erradicó. Es probable que el AS tuviera una función muy importante en este proceso. En la actualidad se ha reportado que en muchas plantas el tratamiento con AS o compuestos afines induce resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Vlot *et al.*, 2009).



**Figura 11.** Síntomas del crecimiento expresados por la inoculación de TSWV, TAV y TSWV-TAV sobre *Lycopersicon sculentum*, A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS v termoterapia.



**Figura 12.** Síntomas de clorosis y manchas por la inoculación de TSWV, TSWV-TAV sobre *Nicotiana rustica* A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS la termoterapia.



**Figura 13.** Síntomas de clorosis y manchas por la inoculación de TSWV, TSWV-TAV sobre *Nicotiana tabacum*. A) antes de la termoterapia y B) después del pretratamiento de AS la termoterapia.

Se han empleado compuestos químicos que directamente eliminen o restrinjan la multiplicación de los virus en las plantas. De Fazio *et al.* (1987), estudiaron el efecto de dos sustancias: ácido acetil salicílico y ácido poliacrílico, estos compuestos fueron asperjados sobre plantas de tabaco a las que luego se inoculó con TSWV. Las dos sustancias inhibieron el desarrollo de lesiones locales y sólo el ácido acetil salicílico disminuyó el porcentaje de plantas infectadas sistémicamente. Ambas sustancias sólo han sido eficaces en condiciones experimentales.

Actualmente es muy importante el uso de compuestos como el ácido salicílico que además de participar en los procesos de tolerancia sistémica, es un compuesto inocuo al ambiente (López-Delgado *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la termoterapia y el cultivo de meristemas pretratados con AS ayudo a erradicar los virus TSWV y TSWV-TAV, en microplantas de crisantemo variedad Polaris white, y esto es muy relevante debido a la importancia de emplear material sano en la producción, las plantas de crisantemo libres de virus tienen un mejor desarrollo en condiciones de campo (Ram *et al.*, 2007), además de que el uso de la micropropagación y escalamiento *in vitro* es de utilidad para el rescate de material vegetativo y conservación de clones de importancia económica, alimenticia y botánica (Nabeta *et al.*, 1983), también para realizar otros trabajos de investigación.

**Parte de la información de este trabajo fue aceptada para su publicación en memorias en extenso** en el XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático. Con título “Ácido salicílico y termoterapia *in vitro* para la erradicación del virus TSWV en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)”. Mexicali Baja California, octubre 2013. ISBN 978-0-9911261-0-1 (Anexo 4).

## 8. CONCLUSIONES

- La optimización de la técnica de indexación debe considerar: la cantidad de buffer adicionado al tejido, la cantidad de muestra para inocular, la cantidad y forma de aplicación del abrasivo (silicón carbide), el tamaño de la herida, el manejo del cultivo (fertilización, riego, prevención de plagas y enfermedades), y los síntomas evaluados.
- El crisantemo variedad Polaris white es sensible a las altas temperaturas (más de 37°C).
- El ácido salicílico incrementa la tolerancia a la termoterapia en microplantas de crisantemo variedad Polaris white.
- En condiciones *in vitro* las microplantas infectadas con el virus TAV son más tolerantes a la termoterapia que las infectadas con TSWV y TSWV-TAV.
- Los virus TSWV y TSWV-TAV presente en microplantas de crisantemo variedad Polaris white se erradicaron utilizando AS, junto con el cultivo de yemas y la termoterapia.
- La verificación de la presencia/ausencia de virus en microplantas de crisantemo variedad Polaris white, por la técnica biológica y serológica coincidieron.

## 9. LITERATURA CONSULTADA

- Adie, B. A., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M. M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J. J., Schmelz, E. A. y Solano, R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19: 1665–1681.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, 5<sup>th</sup> edition. Academic Press. New York. USA. 922 pp.
- Albouy, J., Flouzat, C., Kusiak, C. y Tronchet, M. 1988. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from *in vitro* cultures of *Cymbidium*. *Acta Hort*. 234: 413-420.
- Albouy, J. y Devergne, J. C. 2000. Enfermedades producidas por virus en plantas ornamentales. Mundi Prensa. Madrid. España. 258 pp.
- Ammirato, P. V., Evans, R., Sharp, R. y Bajaj, Y. P. S. 1990. Handbook of plant cell culture, vol. 5: ornamental species. McGraw-Hill. New York, USA. 833 pp.
- Aquino, H. O. 2005. Distribución de virus y efecto del ácido acetil salicílico y compuestos orgánicos en la severidad de virosis y roya blanca en tres variedades de crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvelev]. Tesis de maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 81 pp.
- Arancibia, R. 1986. Identificación de virus asociados al enrollamiento de la hoja de vid presentes en cv. Black seedless y la obtención de plantas limpias mediante termoterapia y cultivo de meristemas. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 373 pp.
- Aranda, O. S. 2002. Enfermedades bacterianas en ornamentales. *In: Manejo Fitosanitario en ornamentales*. Bautista, M. N., Alvarado, J. L., Chavarín, P. J. C. y Sánchez A. S (Eds.). Estado de México, 156 pp.
- Arbos, L. A. M. 1992. El crisantemo: cultivo, multiplicación y enfermedades. Mundi-Prensa. Madrid, España. 170 pp.

- Arun Kumar, G. S., Kamanna, B. C. and Benagi, V. I. 2011. Management of Chrysanthemum leaf blight caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under field conition. *Plant Archives* 11(1): 553-555.
- Barrios, S., Palmieri, M. y Espinoza, M. 2006. Biological differentiation and molecular characterization of *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) isolates from Chrysanthemum plant. *Phytopathology*. Pol. 37: 45-57.
- Bautista, M. N., Alvarado, J. L., Chavarín, P. J. C. y Sánchez A. S. 2002. Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Colegio de Posgraduados. México. 237 pp.
- Best, R. J. 1968. *Tomato Spotted Wilt Virus*. *Advances in Virus Research* 13: 65-146.
- Blom-Barnhoorn, G. J. y Van-Aartrijk, J. 1985. The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected *Lilium* bulb-scale explants in the presence of virazole. *Acta Hortic.* 164: 163-168.
- Bond, W. P., Whitam, H. K. y Black, L. L. 1993. Indigenous weeds as reservoirs of Tomato spotted wilt in Louisiana. *Phytopathology* 73: 499 (Abstr.).
- Brierley, P. 1955. Symptoms induced in chrysanthemums on inoculation with the viruses of mosaic, aspermy and flower distortion. *Phytopathology* 45: 2-7.
- Brison, M., De Boucaud, M. T., Pierronnet, A. y Dosba, F. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. *Plant Science* 123, 189–196.
- Cárdenas-Alonso, M. R. 1994. Las enfermedades causadas por virus en ornamentales en México y alternativas de solución. *Revista Chapingo*. Serie Horticultura 1: 124-130.
- Castillo, G. 2001. Producción de plantas libres de *Cylindrocarpon destructans*, agente causal del mal del pié negro en *Vitis vinifera* cv red globe. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 91 pp.
- Clark, M. F. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-484.

- Centro Internacional de la Papa. 1987. Mejoramiento de la batata (*Ipomoea batatas*) en Latinoamerica. Memorias del "Seminario sobre mejoramiento de la batata (*Ipomoea batatas*) en Latinoamerica". CIP. Lima. Junio 9-12. 277 pp.
- Conti, M., Gallitelli, D., Lisa, V., Lovisolò, O., Martelli, G.P., Ragozzino, A., Rana, G.L. y Vovlas, C. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi-Prensa. Madrid. España. 206 pp.
- Converse, R. 1994. La preparación de clones de plantas libres de virus. Séptimo Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago (Chile). 10-14 Ene 1994: 167-168.
- De la torre A. R., Cervantes, D. L., Houston, H. A. y Valverde, R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la Marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia* 36(2): 211-221.
- Defazio, G., Kudmatsu, M. y Vicente, M. 1987. Efeito antiviral do ácido acetilsalicílico e do ácido poliacrílico sobre o virus do viraçabeza do tomateiro em plantas do fumo. *Fitopat. Bras.* 12: 53-57.
- Dena, S. M. 1997. Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación del virus del ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, México 87 pp.
- Deogratias, J. M., Dosba, F. y Lutz, A. 1988. Elimination of PDV, NRSV and CLSV from cherries by means of *in vitro* culture. *Acta Horticulturae* 235:189.
- De Blas, C., Zabalgoageazcoa, I., Castro, S. y Romero, J. 1996. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. *In: Patología vegetal*. Yacer, G.; López, M.; Trapero, A. y Bello, A. (Eds). *Phytoma*. 255-274 pp.
- Enríquez, V. J. R., Velásquez, T. B., Vallejo, F. A. R. y Velasco, V. V. A. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(4): 377-383.
- Espinoza, N. O., Estrada, R., Silva-Rodríguez, D., Tovar, P., Lizarraga, R. and Dodds, J. H. 1986. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture* 15: 21-26.

- Espinoza, R. M. 2012. Producción de plantas de crisantemo libres de virus utilizando termoterapia y cultivo de meristemos. Proyecto Fodecyd No. 086-2006. Informe Técnico. Guatemala.
- Esquivel, P. A. G., Villanueva, C. E., Pérez, G. A., Sánchez, C. L. A. y Fuentes, C. C. F. J. 2005. El daminozide aumenta el diámetro de inflorescencia del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), cultivar polaris White. *Revista Chapingo*. Serie horticultura 11(2): 361-364.
- García, V. R. 2001. Estudio preliminar del manejo integrado del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Polaris, en Villa Guerrero, Estado de México. *Tesis de maestría*. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 81 pp.
- Gella, R., López C. M., Toribio, F. y Marin, J.A. 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. *Acta Hort.* (ISHS) 480:173-178.
- Germán, L. T., Ullman, D. E. y Moyer, J. W. 1992. Tosposvirus: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review Phytopathology* 30: 315-348.
- Goldbach, R. y Peters, D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5: 113–120.
- González, E., Mosquera, M.V., San José, M. C. y Díaz, T. 1997. Influence of virus on the chlorophyll, carotenoid and polyamine contents in grapevine microcuttings. *Journal of Phytopathology* 145 (4): 185-187.
- González, A. G., Font, C. y Valdés, R. S. 2002. Diagnóstico de virus vegetales a nivel de grupo en el cultivo del pimiento (*Capsicum annum* L.) mediante la técnica de microscopía óptica. *Fitosanidad* 6(3): 3-7.
- González, P. R. A. y Huarte, M. 2011. Efecto del ácido salicílico en la eliminación de PLRV y PVY en plantas de papa. *Revista Latinoamericana de la Papa* 16(1): 58-67.
- Govier, D. A. 1957. The properties of tomato aspermy virus and its relationship with cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 45: 62-73.

- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W. y Kennedy, G. G. 2002. The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of Tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 86: 573-582.
- Handley, M. K. y Horst, R. K. 1988. The effect of temperature and light on chrysanthemum stunt viroid infection of florists chrysanthemum. *Acta Hort.* 234: 89-97.
- Heinz, C. R. T. Q., Thompson, F., Rabindranath, M., Marin, S. J., Lara, M. J. L., Flores, D. M., Alcalá, J. J. A. 2013. Malezas hospederas de *Frankliniella occidentalis* y reservorios del virus del bronceado del tomate en el Altiplano mexicano. *Fitosanidad.* 17(1):5-9.
- Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swenen, R., Lepoivre, P. y Frison, E. 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 20:1117–1122.
- Hernández, R., Noa, J. C., Pichardo, T. y Igarza, Y. 1995. Saneamiento al Complejo Viral del Ajo (*Allium sativum*. L), mediante termoterapia y cultivo meristemo. Cuaderno de Fitopatología. No. 47.
- Hernández, P. R., Igarza, C. Y., Lilia, P.E., Fontanella, J., Pichardo, M. T., Sarria, H. Z., Noa, C. J. C., García, L., Rodríguez, M. y Alfonso, E. 1996. Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) Memorias del XXIII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara. Jalisco. México.
- Hernández, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos *In: Curso Teórico-Práctico de propagación masiva de plantas.* Instituto de Biotecnología de las plantas. 31-43 pp.
- Hiruki, C. 1975. Factors affecting bioassay of potato virus S in *Chenopodium quinoa*. *Phytopathology* 65: 1288-1292.
- Hollings, M. y Stone, O. M. 1971. Tomato Aspermy Virus. *In: Descriptions of plant viruses* Commonwealth Mycological Institute-Association of Applied Biologists, United Kingdom. Rev. No. 79 pp.

- Horst, R. K. 1990. Chrysanthemum. Pp 319-336. *In: Handbook of plant cell culture*. Vol. 5. Ornamental species. Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp W.R. and Bajaj, Y.P.S. (Eds). Mc. Graw-Hill publishing. New York. U.S.A 833 pp.
- Horst, K. R. y Nelson, E. P. 1997. Compendium of *Chrysanthemum* Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesots, USA. 62 pp.
- Horst, R. K., y Cohen, D. 1980. Amantadine supplement tissue culture medium: a method for obtaining chrysanthemum free of chrysanthemum stunt viroid. *Acta Hortic.* 110: 311-315.
- Hull, R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Fourth Edition. Academic Press. NY. 1001 pp.
- Humphreys, J. M. y Chapple, C. C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 224-229.
- <http://www.saberdeciencias.com.ar/index.php/apuntes-de-virologia/180-virologia-diagnostico-virologico-metodos-directos>. En línea: citado 4 de febrero de 2014.
- Jae-Hyun, K., Gug-Seoun, C., Jeong-Soo, K. y Jang-Kyung, C. 2004. Characterization of *Tomato spotted wilt virus* from Paprika in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20: 297-301.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, E. I. y Páldi, E. 2000. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 45:29-33.
- Jayasinghe, U. y Chuquillanqui, C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus de papa. Guía de investigación CIP 21. Centro Internacional de la papa, Lima, Perú. 28 pp.
- Jones, T. D., Buck, K. W. y Plumb, R. T. 1991. The detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 35: 287-296.
- Jones, J. 2000. Plagas y enfermedades del tomate. Mundi-Prensa. Madrid. España. 100 pp.
- Kackar, A., Bhat S., Chandel K. and Malik, S. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 32: 289-292.

- Kelaniyangoda, D. B. and Madhubashini, L. W. M. 2008. Indicator plants: Tools for detecting *Papaya Ring spot potyvirus* and *Cucumber mosaic cucumovirus*. *Journal of Food and Agriculture* 1: 64-69.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. 2006. Conceptos de genética. 8ª edición. Prentice Hall Iberia, Madrid. 884 pp.
- Kumar, A. G. S. 2008. Studies on leaf blight of chrysanthemum caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Thesis of master in Plant Pathology. *University of Agricultural Sciences*. Dharwad, India. 85 pp.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. y Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583-593.
- López, D. H., Zavala, Q. T. y Cadena, H. M. A. 1985. Obtención y conservación de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) libres de virus. SARH. Chapingo, Méx. México. Folleto misceláneo No. 3.
- López-Delgado, H., Mora-Herrera, M. E., Zavaleta-Mancera, H. A., Cadena-Hinojosa, M. and Scott, I. M. 2004. Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research* 81:171-176.
- Lopez-Delgado, H. A., Scott, I. M. and Mora-Herrera, M. E. 2007. Stress and antistress effects of salicylic acid and acetyl salicylic acid on potato culture technology. Pp. 163-195. *In: Salicylic Acid-A Plant Hormone*. Hayat, S. and Ahmad, A. (Eds.) Springer. Dordrecht. The Netherlands. New York 163-195 pp.
- Luppichini, M. 2000. Termoterapia y cultivo de meristemas para la eliminación del virus del enanismo amarillo de la cebolla, en un clon de ajo. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile. 254 pp.
- Mader, S. S. 2008. Biología. 9<sup>th</sup>. Mc Graw-Hill-Interamericana. México, D.F. 952. pp.
- Majada, J. P., Fal, M. A., Tadeo, F. R. and Sánchez-Tames, R. 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. *In vitro Cell. Developmental Biology* 38: 272-278.

- Matthews, R. E. F. 1991. Defective interfering particles. *In: Plant virology* 3d Ed., Academic Press Inc., San Diego, California, 192-194 pp.
- McPherson, M. J., Quirke, P. y Taylor, G. R. 1991. PCR: A practical Approach. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom 171–186 pp.
- Mendoza, Z. C. 2002. Fungicidas en ornamentales pp. 119-120. *In: Bautista, M. N., Alvarado, J. L., Chavarín, P. J. C. y Sánchez A. S. (Eds). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 237 pp.*
- Morales-Díaz, Ma. V., Alcacio-Rangel, S. y De la Torre- Almaraz, R. 2008. Tomato Spotted Wilt Virus: agente causal de la marchitez del miguelito (*Zinnia elegans* Jacquin) en el estado de Morelos, México. *Agrociencia* 42(3): 335-347.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51(1): 263-73.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays' whit tobacco cultures. *Physiolgia Plantarum* 15: 473- 497.
- Nacimiento, L. C., Pio-Ribeiro, G., Willadino, L. and Andrad, G. P. 2003. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola* 60(3):525-530.
- Nault, L. R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *In Annals of the Entomological Society of America* 521-541 pp.
- Ng, J. C. and Perry, K. L. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology* 5(5): 505-511.
- Ng, J. C. and Falk, B. W. 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathology* 44:183-212.
- Nabeta, K., Ohnishi Y., Hirose T. and Sugisawa, H. 1983. Monoterpenebiosíntesis by callus tisúes and suspension cells from *Perilla* species. *Phytochem.* 22: 423-425.
- Nicolás, O. and Laliberté, J. F. 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of *turnip mosaic potyvirus*. *Journal of Virological Methods* 32: 57-66.

- Ocampo, O. T., Ochoa, M. D. L., Ramírez, R. S., Valdovinos, P. G. y Nava, D. C. 2013. Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) en México. *Revista Internacional de botanica experimental* 82: 235-241.
- Ochoa-Martínez, D. L., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G. and Johansen-Naime, R. M. 1999. Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Pathology* 48: 707-717.
- Olmos, A., Bertoni, E. and Cambra, M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methodos* 106: 51-59.
- Olivera, O. V. Z., Gutiérrez, E. M. A., Gutiérrez, E. J. A. y Andrade, R. M. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12(3): 75-80.
- Orozco, H. M. E. y Mendoza, M. M. 2003. Competitividad local de la agricultura ornamental en México. *Revista científica Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México* 10(1):29-42.
- Pandya, H. P. and Saxena, O. P. 2001. Preservation the *Chrysanthemum* sp. by drying. *Acta Horticulturae* 543: 367-370.
- Panta, A. y Golmirzaie, A. 1997. Fascículo 4.2. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos con fines de producción de semillas de papa. Centro internacional de la papa (CIP). 8 pp. [www.cipotato.org/training/Materials/Tuberculos-Semilla/semilla4-2.pdf](http://www.cipotato.org/training/Materials/Tuberculos-Semilla/semilla4-2.pdf). En línea: citado 21 de enero de 2014.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Third Edition. Nartinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 326 pp.
- Plumb, R. T. 2002. Other Vectors. *In: Advances in botanical research*. Plumb R. T. (Eds.) Academic Press, San Diego, CA, USA 199-202.
- Power, A. G. 2000. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 336-340.

- Ram, R., Verma, N., Singh, A. K. y Zaidi, A. A. 2007. Virus-free chrysanthemums: Production and quality management. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(10): 940-949.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. 2<sup>a</sup> ed. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA. 375 pp.
- Reddy, D. V. R. and Wightman, J. A. 1988. Tomato Spotted Wilt Virus: Thrips transmission and control. *In: Advances in Disease Vector Research*, Vol.8. Springer-Verlag, New York 203-220 pp.
- Rizos, H., Jun, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of *cucumber mosaic virus* isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.
- Rosales, V. M., Sepúlveda, R. P., Rojas, B. C., Mediana, V. C., Sepúlveda, Ch. G., Brown, J. K. y Mora, R. R. 2011. Virus transmitidos por insectos vectores en Tomate, en la región Arica y Parinacota: situación actual y manejo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA. No.224. 64 pp.
- Salas, S., Arcia, A. y Malaguti, G. 1972. Estudio preliminar sobre las virosis en pimiento (*Capsicum annuum*) en Venezuela. *Agronomía tropical*. 22(1):45-55.
- Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro internacional de la Papa. Lima, Perú. 226 pp.
- Sánchez, G. E., Slack, S. A. y Dodds, J. H. 1991. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy. *American Potato Journal* 68:299-315.
- Sánchez, H. R. A. 2012. Obtención de plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White libres de los virus TAV y TSWV empleando termoterapia *in vitro* y cultivo de yemas laterales. Tesis de licenciatura en Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Tenancingo, Edo. de México. 72 pp.
- Schafer-Menuhr, A. 1996. Refinement of cryopreservation techniques for potato. Final Report for the Period September 1991- August 1996. IBPG Report. International Plant Resources Institute, Roma, 41 pp.

- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción anual agrícola de México. [Disponible en línea].  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (Consultado el 28 de Abril del 2013).
- Soler, S., Diez, M. J. M. y Nuez, F. 1998. Tendencia a la recuperación en plantas de *Lycopersicon* inoculadas mecánicamente con TSWV. *In XI Jornada de selección y mejora de plantas hortícolas*. Departamento de biología. Universidad Politécnica Camino de Vera. España 328 pp.
- Soto, A. R. y García, F. A. 2006. El Estado de México confirma su liderazgo en floricultura. Para muestra una flor. [En línea]. Disponible en [http://www1.edomexico.gob.mx/pv\\_obj\\_cache/pv\\_obj\\_id\\_E782A0C1EDB8ABD430C80DCC59C3345798600300/filename/20-21.pdf](http://www1.edomexico.gob.mx/pv_obj_cache/pv_obj_id_E782A0C1EDB8ABD430C80DCC59C3345798600300/filename/20-21.pdf). (Consultado el 21 de septiembre del 2009).
- Valencia, L. J. B. 2011. Manejo Bio- racional de plagas y enfermedades en crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. Harman. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo Texcoco Estado de México. México 164 pp.
- Valenzuela-Herrera, V. y Redondo-Juárez, E. 2002. Detección de virus por serología y plantas indicadoras en el tubérculo-semilla y plantas de cultivo de meristemas en papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 33.
- Valenzuela, H. V., Redondo, J. E. y Bujanos, M. R. 2003. Detección de Virus por Serología indicadoras en el tubérculo-semilla y plantas de cultivo de meristemas en papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. *Revista mexicana de fitopatología* 21(2): 176-180.
- Vlot, A. C. Dempsey, D. A. and Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Wang, Q.; Lui, Y.; Xie. and You; M. 2006. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leaf roll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY). *Potato Research* 49:119-129.

White, R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.

Yudin, L. S., Tabashnik, B. E., Cho, J. J. and Mitchell, W. C. 1988. Colonization of weeds and lettuce by thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Annals of the Entomological Society of America* 17: 522-526.

## 10. ANEXOS

### Anexo. 1

#### Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962, MS)

Preparación de sales			
Sustancia	Fórmula	Cantidad para 1000 mL	Cantidad para 2000 mL
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	17.5 g	35 g
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	20 g	40 g
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.5 g	9 g
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75 g	3.5 g
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BOP <sub>3</sub>	50 mg	100 mg
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	200 mg	400 mg
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100 mg	200 mg
Yoduro de potasio	KI	10 mg	20 mg
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.5 mg	5 mg
Sulfato cúprico 5.0 mg	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5 mL de la solución preparada.	1 mL de la solución preparada.
Cloruro de cobalto 5.0 mg*	CuCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		

\*mg (miligramos).

**NOTA:** De estas dos últimas sustancias se pesan 5 mg de cada una y se disuelven en agua destilada, se aforan a 10 mL y se toma 1 mL para preparar 2 Litros y 0.5 mL para 1 litro.

### Soluciones para el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

Solución		Para 1000 mL	
Sales		100 mL	
Sulfato de magnesio (Mg SO <sub>4</sub> )		10 mL	
Inositol		10 mL	
Hierro (Fe)		5 mL	
Tiamina		1 mL	
Pantotenato de calcio		2 mL	
Glicina		0.5 mL	
Azúcar		30 g	
Agar	Agar-agar	6.0 g	
	Agar bacteriológico	7.5 g	
	Fita gel	Cloruro de magnesio	2.35 g y 0.5 mL

Para la realización del medio de cultivo se siguen los siguientes pasos:

- Se mezclan todas las soluciones (líquidos) en un recipiente con agua destilada.
  - Nota: el pantotenato de calcio se descongela antes de usarlo.
- Posteriormente se agrega el azúcar, dejando agitar hasta que la solución se disuelva.
- Se afora la solución a la cantidad requerida.
- Se mide el pH llevando la solución a 5.6-5.7
  - Nota: utilizar hidróxido de potasio (KOH) para subirlo y ácido clorhídrico (HCl) para bajarlo.
- Se agrega el agar y se tapa con plástico transparente.
- Se calienta la solución para disolver el agar.
- Finalmente se sirve en los frascos o tubos a utilizar.

## Anexo 2.

### Soluciones para DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) con modificaciones para crisantemo (Sánchez, 2012).

#### 1.- Solución madre del amortiguador de lavado (PBST-10X).

Formula	Denominación	Cantidad
(NaCl)	Cloruro de sodio	40.00 g
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fosfato dibásico de sodio anhidro	7.75 g
(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fosfato monobásico de potasio anhidro	1.00 g
(KCl)	Cloruro de potasio anhidro	1.00 g
(Tween-20)	Monolaurato de polietilensorbitán	2.50 mL
(H <sub>2</sub> O)	Agua destilada, aforar a:	500 mL
pH		7.4

**Nota:** Almacenar a 4°C

#### 2.- Solución amortiguadora de extracción.

Formula	Denominación	Cantidad
	Albumina de huevo	0.300 g
(Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	Sulfito de sodio anhidro	0.195 g
PVP-40	Polivinilpirrolidona	3.000 g
(NaN <sub>3</sub> )	Azida de sodio anhidro	0.030 g
(Tween-20)	Monolaurato de polietilensorbitán	3.000 mL
PBST-1X	Amortiguador de lavado, aforar a:	150 mL
pH		7.4

3.- Solución amortiguador de conjugado (ECI – Buffer).

Formula	Denominación	Cantidad
	Albumina de Bovino	0.300 g
<b>PVP-40</b>	Polivinilpirrolidona	3.000 g
<b>(NaN<sub>3</sub>)</b>	Azida de sodio anhidro	0.030 g
<b>PBST-1X</b>	Amortiguador de lavado, aforar a:	150 mL
<b>pH</b>		7.4

4.- Solución amortiguador de cobertura.

Formula	Denominación	Cantidad
<b>(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	Carbonato de sodio anhidro	0.238 g
<b>(NaHCO<sub>3</sub>)</b>	Bicarbonato de sodio anhidro	0.437 g
<b>(NaN<sub>3</sub>)</b>	Azida de sodio anhidro	0.030 g
<b>(H<sub>2</sub>O)</b>	Agua destilada, aforar a:	150 mL
<b>pH</b>		9.6

5.- Solución amortiguador de sustrato.

Formula	Denominación	Cantidad
<b>(MgCl<sub>2</sub>)</b>	Cloruro de magnesio anhidro	0.0025 g
<b>(NaN<sub>3</sub>)</b>	Azida de sodio anhidro	0.0050 g
<b>C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub></b>	Dietanolamina (bis-2-Hidroxiethylamida)	2.420 mL
<b>(H<sub>2</sub>O)</b>	Agua destilada, aforar a:	150 mL
<b>pH</b>		9.6

## TÉCNICA DAS-ELISA

### 1.- COBERTURA

Marcar con un plumón indeleble el número de pozos a utilizar, considerando el número de muestras, su repetición, blancos, testigos negativos y testigos positivos.

Cubrir la placa de ELISA con el anticuerpo diluido en solución amortiguadora de cobertura 1X en base a la dilución 1:200. Colocar 100µL de anticuerpo diluido en cada perforación de la placa. Es importante cubrir la placa inmediatamente después de preparar la dilución, esto debido a que muchos anticuerpos pueden perderse si pasa mucho tiempo entre la preparación de la disolución y la cobertura.

### 2.- INCUBACIÓN

Incubar la placa en cámara humedad por 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C.

### 3.- LAVADO

Lavar la placa vaciándola vigorosamente y llenando las perforaciones con amortiguador PBST 1X. Repetir este proceso de 3 a 8 veces. Colocar la placa hacia abajo en papel absorbente.

### 4.-PREPARACIÓN DE MUESTRAS

a) Hojas; seleccionar hojas con síntomas del virus e introducirlas a una bolsa de plástico para macerarlas.

Realizar una disolución de las muestras a evaluar en proporción 1:10 (volumen de sabia: volumen de amortiguador) utilizando la solución amortiguadora general de extracción. Colocar 100 µl de sabia diluida en cada pozo.

Registrar croquis de trabajo.

Preparación de los controles positivos: Preparar los controles, se utilizan 2 mL de la solución amortiguadora general de extracción. Después de prepararlo, dividirlo en alícuotas, estos controles deberán estar en refrigeración a -20°C.

### 5.- INCUBACIÓN

Colocar Incubar la placa en cámara húmeda e incubar por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C.

## **6. LAVADO**

Repetir la operación del punto 3 con extremo cuidado.

## **7.- PREPARACIÓN DEL CONJUGADO**

Utilizar el amortiguador ECL para preparar el conjugado enzimático unos minutos antes de que se cumpla la incubación anterior, utilizando una disolución de 1:200. Colocar 100 µl de la disolución en cada perforación.

## **8.- INCUBACIÓN**

Colocar Incubar la placa en cámara húmeda e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

## **9.- LAVADO**

Repetir la operación del punto 3 con extremo cuidado.

## **10.- PREPARACIÓN DEL SUBSTRATO**

Utilizando una tableta de PNP por cada 5 mL de amortiguador PNP, preparar el sustrato. Es importante preparar 15 minutos antes de utilizarse. Colocar 100 µL de la solución en cada perforación. Se debe de tener en cuenta que las tabletas no deben de ser colocadas con los dedos, y la solución amortiguadora de PNP no debe exponerse a la luz.

### Anexo 3.

Efecto del ácido salicílico en la erradicación de los virus TSWV, TSWV-TAV, verificadas por indexación.

**Cuadro 10.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre jitomate por inoculación mecánica.

Síntoma		Expresión del síntoma			
		Testigo	Con AS Negativa a TSWV	Sin AS + TAV	Con AS Negativa a TSWV-TAV
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	14.5-21	Nula	Nula	Nula	Nula
<b>Media</b>	22-29	(38.90)	(39.40)	(37.40)	(39.60)
<b>Leve</b>	30-36				
<b>Nula</b>	≤37				
<b>Mosaico</b>		No	No	No	No
<b>Anillos cloróticos</b>		No	No	No	No
<b>Anillos necróticos</b>		No	No	No	No
<b>Marchitez</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	No	No	No
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No
<b>% de inhibición en el crecimiento</b>		0	2.5	13.7	1.7

+ positiva.

**Cuadro 11.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre *Nicotiana rustica* por inoculación mecánica.

Síntoma		Expresión del síntoma			
		Testigo	Con AS Negativa a TSWV	Sin AS +	Con AS Negativa a TSWV-TAV
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	3.8-10	Nula	Nula	Nula	Nula
<b>Media</b>	11-17	(35.53)	(33.53)	(38.86)	(38.1)
<b>Leve</b>	18-24				
<b>Nula</b>	≤25				
<b>Mosaico</b>		No	No	No	No
<b>Anillos cloróticos</b>		No	No	No	No
<b>Anillos necróticos</b>		No	No	No	No
<b>Marchitez</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	No	No	No
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No

+ positiva.

**Cuadro 12.** Verificación de la erradicación del virus TSWV y TSW-TAV sobre *Nicotiana tabacum* por inoculación mecánica.

Síntoma		Expresión del síntoma			
		Testigo	Con AS Negativa a TSWV	Sin AS +	Con AS Negativa a TSWV-TAV
<b>Clorosis</b>					
<b>Severa</b>	0-4	Nula	Nula	Nula	Nula
<b>Media</b>	5-9	(28.7)	(31.27)	(21.5)	(26.46)
<b>Leve</b>	10-13				
<b>Nula</b>	≤13				
<b>Mosaico</b>		No	No	No	No
<b>Anillos cloróticos</b>		No	No	No	No
<b>Anillos necróticos</b>		No	No	No	No
<b>Marchitez</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales cloróticas</b>		No	No	No	No
<b>Lesiones locales necróticas</b>		No	No	No	No
<b>Necrosis</b>		No	No	No	No

+ positiva.

#### Anexo 4.

Resumen en extenso del XVI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas.

Producción y protección de cultivos: Bajo un escenario de cambio climático. Mexicali Baja California, octubre 2013. “ISBN 978-0-9911261-0-1”



XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

*SIMPOSIO: PRODUCCIÓN DE CULTIVOS EN INVERNADERO Y CAMPO BAJO CONDICIONES DE ZONAS ÁRIDAS*

*SIMPOSIO: ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE PATOGENOS DEL SUELO*

**XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas**

**24 y 25 de octubre de 2013**

**Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático**

## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**



## **XVI CONGRESO INTERNACIONAL EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**MEMORIAS**

**Mexicali Baja California México**

**24 y 25 de octubre del 2013**

**ISBN 978-0-9911261-0-1**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**

**GobBC**  
Secretaría de Fomento Agropecuario

**SAGARPA**

**MEXICALTI**

**XVI**  
Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas  
Investigación y protección de cultivos: hacia un desarrollo de sistemas sustentables

**Organizado por el presente**

# Constancia

## A: Rogel Millán Gloria

Por su participación como Ponente en el Congreso, los días 24 y 25 del presente, en la ciudad de Mexicali.

Mexicali, Baja California, octubre de 2015

Por la realización plena del honorario

**Dr. Roberto Zoro Ortiz**  
Director del Instituto de Ciencias Agrícolas

**Dr. Manuel Cruz Villalón**  
Presidente del INIA-CAL

**M.C. Jacobo Estrada Cruz Ortega**  
Director de la Facultad de Agronomía (FA)

**Dr. Jesús López Flores**  
Director del Estado de Baja California y Querétaro UNIQ

**AFROMEXICO**

**GOVAM**  
GOBIERNO DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA

**INIA CAL**

**Trigosea**

**H.M. HARRIS MORAN**

**UNIQ**

## ÁCIDO SALICÍLICO Y TERMOTERAPIA *in vitro* PARA LA ERRADICACIÓN DEL VIRUS TSWV EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)

Rogel Millán Gloria<sup>1</sup>, Mora Herrera Martha Elena<sup>1</sup>, García Velasco Rómulo<sup>1</sup> y López Delgado Humberto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. km 1.5, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 52400, México. Tel. 01 714 140 77 24, Ext. 176, FAX. 01 714 140 77 25. E-mail: [marthaelenam@gmail.com](mailto:marthaelenam@gmail.com) <sup>2</sup>Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), SEDAGRO Metepec, Edo. Méx. México. 52140

### Resumen

Se detectó por serología (DAS-ELISA) al virus *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris White. Se empleó ácido salicílico (AS) en la termoterapia *in vitro* para la erradicación del virus. Se subcultivaron microplantas negativas al virus TSWV en 0 y 10<sup>-5</sup> M de AS por 28 días, posteriormente se subcultivaron a medio MS sin AS y se expusieron a temperaturas de 37, 37.5 y 38°C por 25 días, evaluando solamente el efecto del AS en la supervivencia de las microplantas, siendo más significativa en microplantas tratadas con AS incrementando hasta un 14.28% con respecto al testigo, a una temperatura de 37°C, exponiendo las microplantas a una temperatura de 37.5°C el AS incremento la supervivencia 5% con respecto al testigo, las microplantas expuestas a 38°C no sobrevivieron después de 15 días. De acuerdo a lo anterior se subcultivaron microplantas positivas al virus TSWV en 0 y 10<sup>-5</sup> M de AS por 28 días posteriormente se subcultivaron en ausencia de AS y se expusieron a temperaturas de 37°C por 30 días. El AS incremento la supervivencia hasta en un 50% con respecto al testigo. Y un 100% de microplantas libres del virus TSWV de acuerdo a DAS-ELISA.

**Palabras clave:** *Supervivencia, DAS-ELISA, Polaris white*

### Abstract

Through serology (DAS-ELISA) the *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) was detected in microplants the chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) cultivar Polaris White. Salicylic acid (SA) was using *in vitro* thermotherapy for virus eradication. Negative microplants to TSWV were cultured in 0 and 10<sup>-5</sup> M of SA for 28 days, then subcultured in medium without SA and exposed to temperatures 37, 37.5 and 38°C for 25 days, to evaluate only the effect AS in microplants survival, most significant being treated with AS microplants up 14.28% increase compared with the control, at a temperature of 37° C, exposing the microplants at 37.5 °C the AS 5% increase survival compared with the control, the microplants exposed to 38 ° C did not survive after 15 days . According to the above positive microplants to TSWV were cultured in 0 and 10<sup>-5</sup> M salicylic acid (SA) for 28 days, then subcultured in medim MS without SA and exposed to temperature 37°C for 30 days. The AS increase survival by up to 50% compared with the control. And a 100% free of virus microplants.

**Key words:** *Survival, DAS-ELISA, Polaris White*

### Introducción

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) es una especie ornamental para maceta y flor de corte con alta demanda en el mercado (Enríquez *et al.*, 2005). Datos demuestran que el crisantemo en el Estado de México en el año 2011 reportó una producción de 2,166 ha sembradas (SIAP, 2013).

Las plantas de crisantemo se propagan vegetativamente de manera convencional, mediante esquejes homogéneos en consistencia y tamaño. Durante los varios ciclos de propagación los patógenos pueden reducir la calidad sanitaria y vigor de las plantas, así como la calidad y valor comercial de las flores cosechadas (Enríquez *et al.*, 2005). El cultivo de crisantemo tiene una limitante en su producción y calidad son los problemas fitosanitarios que se presentan a lo largo del cultivo (Bautista *et al.*, 2002). Entre las principales enfermedades que atacan a este cultivo están las ocasionadas por varios virus y hongos (Cárdenas, 1994).

La diversidad de síntomas virales que pueden observarse en campo depende de varios factores tales como: el hospedante, edad de la planta, época del año, estado fisiológico de la planta, entre otros (German *et al.*, 1992; Aquino, 2005); una práctica útil para el control de estos agentes es el manejo de semilla agronómica (clonación) certificada, libre de virus, el método más eficaz y económicamente viable es el cultivo *in vitro* (Agris, 2004; Valenzuela *et al.*, 2003).

En la zona florícola del Estado de México se ha reportado la presencia de los virus: *Tomato Aspermy Virus* (TAV) y el *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) el virus de la marchitez manchada del tomate, que es considerado uno de los diez virus más importantes (Best, 1968).

En el crisantemo variedad Polaris, los síntomas se manifiestan principalmente a altas temperaturas y más comúnmente al momento de la aparición de los botones florales, lo cual produce daños severos al reducir el rendimiento hasta en un 90%. El síntoma característico que produce el TSWV en esta variedad de crisantemo consiste en necrosis sistémica en tallo que impide el paso de nutrimentos y posteriormente clorosis generalizada, marchitamiento y muerte de la planta (Cárdenas, 1994).

Desde 1980 ha ocurrido una rápida distribución geográfica del TSWV, que fue precedida por la expansión de su principal insecto vector, el trips *Frankliniella occidentalis*, cuya abundancia y distribución se ha relacionado con la incidencia de TSWV (Reddy y Wightman, 1988; Goldbach y Peters, 1994).

Los virus se propagan generalmente por vectores biológicos, aunque, las prácticas culturales de multiplicación vegetativa, transmite los virus por contacto, o bien también hay transmisión por semilla o por los intercambios comerciales (Albouy y Devergne, 2000). Para los virus los métodos de control en campo no son posibles de ahí que lo importante es la detección a tiempo, en el material vegetativo que se propagará.

Los principales métodos de diagnóstico de virus vegetales son: análisis inmunoenzimático ELISA mediante anticuerpos específicos de los antígenos virales (Clark y Adams, 1977); técnicas de ácidos nucleicos en la virología vegetal (Hull, 2002); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986); y por indexación biológica (Albouy y Devergne, 2000). Una vez detectados los virus deben erradicarse, pero presenta ciertas dificultades que han llevado a proponer varios métodos como: cultivo de meristemas, tratamiento de calor (termoterapia) y/o quimioterapia (López *et al.*, 1985; Horst, 1990; Albouy y Devergne, 2000). Dentro de estos la termoterapia es la más utilizada por que permite la aceleración de los procesos para obtener plantas sanas, debido a que los tratamientos se pueden realizar durante todo el año y muchas plantas pueden ser tratadas al mismo tiempo, así se incrementan las oportunidades de sobrevivencia de clones sanos (Gella *et al.*, 1998).

Un método alternativo ha sido el cultivo de meristemas que mientras más pequeño es el tamaño del explante, mayor es la posibilidad de eliminación de patógenos. Si se usa en combinación con la termoterapia o quimioterapia, puede aumentarse la posibilidad de producir plantas libres de virus (Castillo, 2001).

López-Delgado *et al.* (2004), reportaron que la termoterapia *in vitro* en combinación con pretratamiento de ácido salicílico (AS), incrementa la erradicación en virus de papa en menor tiempo, esto debido a que el AS participa en repuestas a la termogénesis. Además se ha reportado que el AS aumenta la resistencia contra la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Vlot *et al.*, 2009).

Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido salicílico en la termoterapia *in vitro* y cultivo de yemas para la erradicación del virus TSWV del crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris White.

Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en el Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en el KM 1.5 de la carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo Estado de México, en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal durante el periodo de Noviembre de 2012 a Junio de 2013.

Se utilizaron microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris White provenientes del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Metepec, Estado de México.

Para la detección del virus TSWV se utilizó la prueba serológica de doble anticuerpo ligado a enzimas (DAS-ELISA) (Clark y Adams, 1977).

Descripción de los experimentos.

**Efecto del AS sobre evaluación de la temperatura.** Yemas axilares de crisantemo negativas (-) a TSWV se subcultivaron en medio MS (cultivo básico Murashige y Skoog (1962) en 0 y  $10^{-5}$  M de AS, después de 28 días se subcultivaron a medio MS, por 5 días permanecieron en condiciones de estándares de cámara *in vitro*. Posteriormente se expusieron a 37, 37.5 y 38°C por 25 días (López-Delgado *et al.*, 2004).

**Efecto de AS en la erradicación del virus TSWV.** Yemas axilares de crisantemo negativas (-) y positivas (+) a TSWV se subcultivaron en medio MS en 0 y  $10^{-5}$  M de AS, después de 28 días se subcultivaron a medio MS, por 5 días permanecieron en condiciones de estándares de cámara *in vitro*. Posteriormente se expusieron a 37°C por 25 días. Las microplantas obtenidas fueron esquejeadas y cultivadas en medio MS por 28 d. Al finalizar se analizaron con la prueba DAS-ELISA.

Las variables evaluadas fueron: supervivencia de plantas y presencia de virus. El diseño experimental fue de bloques al azar con 40 plantas por tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ( $P \leq 0.05$ ).

Resultados y Discusión

Efecto del AS sobre evaluación de la temperatura

Las microplantas pretratadas con AS incrementaron significativamente la supervivencia con respecto al testigo en un 14.28% a 37°C; 5% a 37.5°C, y a 38°C las microplantas solo sobrevivieron 10 días con un incremento de 6.67%. Cuadro 1. López-Delgado *et al.* (2004), reportaron que en papa a 42°C por 30 días se obtuvo de un 40 a 100% de supervivencia en plantas tratadas con ácido salicílico y de 0 a 96% en los testigos. Por lo que el crisantemo es muy sensible al calor con respecto a la papa.

Cuadro 1. Evaluación de la supervivencia de microplantas negativas al virus TSWV a los tratamiento de temperatura de 37, 37.5 y 38°C por 25 días, con pretatamiento de AS a una concentración de  $10^{-5}$ M.

Temperatura °C	Tratamiento	Porcentaje de supervivencia	
		a 10 días de tratamiento	a 25 días de tratamiento
38.0	Sin ácido salicílico	60.00	
	Con ácido salicílico	66.67*	
37.5	Sin ácido salicílico	75.00	25.00
	Con ácido salicílico	50.00	30.00*
37.0	Sin ácido salicílico	100.00	57.14
	Con ácido salicílico	100.00	71.43*

\*Diferencia estadística t Student ( $P \leq 0.05$ ).

Efecto de AS en la erradicación del virus TSWV

Teniendo por mejor opción la temperatura de 37°C debido al alto porcentaje de supervivencia se tomó como referencia para someter a las microplantas positivas al virus TSWV. La supervivencia de microplantas positivas al TSWV a los 30 días de exposición a 37°C fue más significativa en microplantas tratadas con AS teniendo una supervivencia de 50% más con respecto al testigo. Cuadro 2. Similar a lo reportado por (López-Delgado *et al.*, 2004) en donde el AS empleado en microplantas para termoterapia a 42°C para eliminar el virus X de la papa (PVX). La supervivencia incremento hasta 40% en microplantas tratadas con SA con respecto a las no tratadas. Por lo que el ácido salicílico ayuda a la supervivencia del crisantemo aun teniendo las microplantas un virus.

**Cuadro 2. Evaluación de la supervivencia de microplantas positivas al virus TSWV a temperatura de 37°C por 30 días, con pretatamiento de Ácido salicílico a una concentración de 10<sup>-5</sup>.**

Muestras	Temperatura °C	Tratamiento	Porcentaje de supervivencia a los 30 días
Negativa	37	Sin ácido salicílico	50.00
Negativa	37	Con ácido salicílico	71.43*
Positivas a TSWV	37	Sin ácido salicílico	15.00
Positivas a TSWV	37	Con ácido salicílico	30.00*

\*Diferencia estadística t Student ( $P \leq 0.05$ ).

La termoterapia y el AS en conjunto erradicaron el virus TSWV (Cuadro 3), posiblemente debido a que el ácido salicílico tiene participación en muchos procesos fisiológicos de las plantas uno de ellos es la inducción de tolerancia a factores de estrés biótico (Levine *et al.*, 1994), además en la actualidad se ha reportado que en muchas plantas el tratamiento con AS o compuestos afines induce la expresión de genes PR y/o resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Vlot *et al.*, 2009) y que en este trabajo se reporta como eficiente el uso de ácido salicílico en combinación con la termoterapia.

**Cuadro 3. Efecto del ácido salicílico y la termoterapia en la erradicación del los virus TSWV en microplantas de crisantemo.**

Porcentaje Resultado del análisis de la prueba DAS-ELISA (1)	Temperatura °C	Tratamiento	Porcentaje Resultado del análisis de la prueba DAS-ELISA (2)
Negativa	37	Con ácido salicílico	Negativa
Negativa	37	Sin ácido salicílico	Negativa
Positivas a TSWV	37	Con ácido salicílico	Negativa a TSWV
Positivas a TSWV	37	Sin ácido salicílico	Positiva a TSWV

### Conclusiones

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris White es sensible a las altas temperaturas. Las microplantas de crisantemo analizadas mediante la prueba DAS-ELISA se encontraron negativas al virus TSWV al final de la termoterapia. El ácido salicílico es un compuesto potencialmente útil para incluirlo como parte de los métodos de la erradicación de virus empleando termoterapia en las plantas de crisantemo.

### Literatura citada

- Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. Edit. Limusa 2da edic. México D.F. 648 p.
- Albouy, J. y Devergne, J. C. 2000. Enfermedades producidas por virus en plantas ornamentales. Ed. Mundi Prensa. Madrid. España. 258 p.
- Aquino, H. O. 2005. Distribución de virus y efecto del ácido acetil salicílico y compuestos orgánicos en la severidad de virosis y roya blanca en tres variedades de crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvelev]. Tesis. Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 81p.
- Bautista, M. N., Alvarado, J. L., Chavarín, P. J. C. y Sánchez A. S. 2002. Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México. 237 p.
- Best, R. J. 1968. Tomato spotted wilt virus. *Advances in Virus Research* 13: 65-146.
- Cárdenas, A. M. R. 1994. Las enfermedades causadas por virus en ornamentales en México y alternativas de solución. *Revista Chapingo*. Serie Horticultura. 1: 124-130.
- Castillo, G. 2001. Producción de plantas libres de *Cylindrocarpum destructans*, agente causal del mal del pié negro en *Vitis vinifera* cv red globe. Memoria de Título (Ingeniero agrónomo). Universidad de Chile: 91p.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-484.

Producción y protección de cultivos Bajo un escenario de cambio climático

- Enriquez, V. J. R., Velásquez, T. B., Vallejo, F. A. R. y Velasco V. V. A. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28(4): 377-383.
- Gella, R., López C. M., Toribio, F. and Marin, J.A. 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. *Acta Hort. (ISHS)* 480:173-178.
- German, L. T., Ullman, D. E. and Moyer, J. W. 1992. Tosposvirus: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review Phytopathology* 30: 315-348.
- Goldbach, R., and Peters, D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5: 113-120.
- Horst, R. K. 1990. Chrysanthemum. En: Handbook of plant cell culture. Vol. 5. Ornamental species. Edited by P.V. Ammirato, d. A. Evans, w.r. sharp and y.p.s. Bajaj. Mc. Graw-hill publishing. Co. New York. 833 p.
- Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology Fourth Edition. Academic Press. NY. 1001 p.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583-593.
- López, D. H., Zavala, Q. T. y Cadena, H. M. A. 1985. Obtención y conservación de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) libres de virus. SARH. Chapingo, Méx. México. Folleto misceláneo No. 3.
- López-Delgado, H., Mora-Herrera, M. E., Zavaleta-Mancera, H. A., Cadena-Hinojosa, M. and Scott, I. M. 2004. Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*. 81:171-176.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1): 263-273.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays' whit tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473- 497.
- Reddy, D. V. R., and Wightman, J. A. 1988. Tomato Spotted Wilt Virus: Thrips transmission and control. In: *Advances in Disease Vector Research*, Vol.8. Springer-Verlag, New York. 203-220 p.
- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción anual agrícola de México. [Disponible en línea]. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (Consultado el 28 de Abril del 2013).
- Valenzuela, H. V., Redondo, J. E., y Bujanos, M. R. 2003. Detección de Virus por Serología indicadoras en el tubérculo-semilla y plantas de cultivo de meristemas en papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. *Revista mexicana de fitopatología* 21(2): 176-180.
- Vlot, A. C. Dempsey, D. A. y Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.