

²Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Metepec, Méx. 52 140 México.

El cultivo de crisantemo es de importancia económica en algunas regiones de México. Uno de sus problemas son los virus que son difíciles de controlar e identificar; por ello la conservación, manejo y limpieza de materiales libres de virus son prácticas eficientes en programas de producción de semilla certificada. El cultivo de meristemos, tratamientos de calor (termoterapia) y/o quimioterapia son técnicas útiles para erradicar virus. Esta investigación tuvo como objetivo obtener plantas de crisantemo variedad Polaris libres de los virus TAV y TSWV empleando ácido salicílico (AS) y termoterapia *in vitro*; los experimentos se iniciaron con microesquejes positivos (+) a los virus estudiados los cuales se incubaron por 30 días en medio MS con 0 y 10^{-5} M AS; después 45 microesquejes por tratamiento fueron trasplantados a medio sin AS por 5 días, después se iniciaron los tratamientos de termoterapia: a) 33°C por 30 días y b) 37°C por 30 días. Al concluir los tratamientos de termoterapia las microplantas fueron subcultivadas a medio MS y a las 6 semanas microplantas hijas se analizaron de manera individual por DAS-ELISA a una densidad óptica de 405 nm. Las microplantas preincubadas en AS en el tratamiento de 33°C por 30 días, mostró mayor porcentaje de supervivencia (55.6%) con respecto al control. El 32% de microplantas fueron negativas a ambos virus, el 44% de microplantas solo fue negativa a TAV y el 76% a TSWV. Las microplantas no incubadas en AS presentó 0% negativas para ambos virus, 9.1% negativo al TAV y 0% negativo al TSWV. En el tratamiento de 37°C por 30 días con 0 y 10^{-5} M AS se obtuvieron supervivencias por debajo del 7%, y de estas solo el 50% fue negativa al TSWV. La combinación del uso de AS con termoterapia es útil para la erradicación de virus en plantas de crisantemo. El AS incrementa la tolerancia a la termoterapia. El virus TAV presenta mayor resistencia a la erradicación.

Palabras clave: Das-ELISA, *Dendranthema grandiflora*, plantas libres de virus

Chrysanthemum TSWV and TAV Virus cleaning plants using salicylic acid and *in vitro* thermotherapy

Chrysanthemum culture is economically important in some regions of Mexico. One of the problems

are viruses which the identification and control is difficult. Certified seed production programs require virus cleaning, conservation and management of virus free plants. Meristem culture-heat treatments (thermotherapy) and /or chemotherapy are useful techniques for getting virus free plants. The objective of this research was to get chrysanthemum cv. Polaris TAV and TSWV virus free plants using salicylic acid (SA) and *in vitro* thermotherapy. Nodal cuttings (+) to the viruses were cultured for 30 days in MS with 0 and 10^{-5} M, then 45 nodal cuttings per treatment were subcultured into SA free medium and cultured for 5 days. Thermotherapy was applied as follows: a) 33 °C and b) 37°C for 30 days each one. After thermotherapy treatments, microplants were subcultured to MS medium and 6 weeks later microplants obtained were individually checked by DAS-ELISA at 405 nm OD. Microplants previously incubated in SA under 33 C treatment for 30 days, showed higher survival percentage (55.6%) respecting the control. 32% of the plants were negatives to both viruses, 44% were negative only to TAV and 76% to TSWV. Microplants no incubated in SA were 0% negative to both viruses, 9.1% negative to TAV and 0% negative to TRWV. On the treatment of 37°C for 30 days with SA 0 and 10^{-5} Mm, survival below 7% was obtained, and only 50% of them were negative to TSWV. The combination of SA-thermotherapy is useful for virus eradication in chrysanthemum plants. SA enhanced tolerance to thermotherapy. TAV virus was more difficult for eradication.

Keywords: Das-ELISA, *Dendranthema grandiflora*, virus-free plants

T1.4 Methodology for *In vitro* establishment of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek

Leonardo Ferreira Dutra^{1*}, Josiane Mendonça Vitória¹, Fernanda Medeiros Zacarias¹, Márcio Paim Mariot², Lorena Pastorini Donini¹

¹Embrapa Clima Temperado Rodovia BR 392, km 78. Caixa Postal 403. CEP 96010-971, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

*e-mail: leonardo.dutra@cpact.embrapa.br,

²IF Sul/Campus Pelotas-Visconde da Graça, Av. Idefonso Simões Lopes, 2791. CEP 96060-290 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. e-mail. marciomariot@gmail.com

Keywords: cytokinins, medicinal plant, micropropagation, nodal segments

Metodología para establecimiento *in vitro* de Congorosa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek)

Maytenus ilicifolia es una especie medicinal nativa del Brasil, que ocurre predominantemente en la Región Sur y se encuentra amenazada de extinción. Normalmente es propagada por semilla, lo que induce una gran variabilidad genética. Por otro lado, las técnicas de propagación vegetativa carecen de respuestas más efectivas. La micropropagación puede proporcionar la producción de plántulas con alto padrón de calidad genética y fitosanitaria, además de ser una alternativa para la conservación *in vitro* de la especie. El objetivo del trabajo fue establecer *Maytenus ilicifolia in vitro* para definir el protocolo de micropropagación para la especie. Se utilizaron segmentos nodales con aproximadamente 1 cm de largo, obtenidos de brotos nuevos de plantas matrices, mantenidas en invernadero. Los explantes se desinfectaron por inmersión en alcohol 70% por 1 minuto, solución de hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos y lavado triple con agua destilada y autoclavada. Después de desinfectados, los explantes se inocularon en medio MS con adición de citoquininas BAP, cinetina y 2IP en las concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg l⁻¹. Transcurridos 35 días de inoculación se evaluaron los porcentajes de sobrevivencia y de establecimiento. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos para porcentaje de sobrevivencia. Sin embargo, los mayores porcentajes de establecimiento se obtuvieron para los explantes sometidos a concentración de 3 mg l⁻¹, independiente del tipo de citoquinina utilizada.

Palabras clave: citoquininas, micropropagación, planta medicinal, segmentos nodales

T1.5 Optimization of *in vitro* shoot multiplication of different pea genotypes

N. Mendler-Drienyovszki*, K. Magyar-Tábori, J. Dobránszki

Research Institute of Nyíregyháza, Centre for Agricultural and Applied Economic Sciences, University of Debrecen, H-4400. Nyíregyháza, Hungary. contact: *e-mail: mendlernedn@gmail.com

Development of *in vitro* technologies is a necessary precondition for the implementation of biotechnological approaches in pea (*Pisum sativum* L.) breeding. In first experiments the effect of different salt contents were tested on

shoot multiplication of our breeding lines ('SzB-0210', '2013' and '2106'). Micro and macro elements of Gamborg and Murashige-Skoog media were used in four combinations. Gamborg vitamins, 0.7% agar-agar, 1.5% sucrose, 0.3 mg l⁻¹ naphthalene-acetic acid, 0.5 mg l⁻¹ benzyladenine were also added to media. Nodal segments of shoots were placed on medium and cultured for 4 weeks at 22°C, and 16h photoperiod. Considering the multiplication rate and shoot lengths slight differences could be detected between media, but medium containing MS macro and Gamborg microelements was selected for further experiments because the rate of hyperhydration and callus development was the least on this medium. Subsequently, the effect of cytokinins (benzyladenine, benzyladenine riboside and meta-topolin) in 0.5 mg l⁻¹ concentration was studied. Because of molar mass equality the benzyladenine riboside was also tested at 0.8 mg l⁻¹ level. The other conditions were same as in the first experiments. The breeding line '2013' did not show differences in the multiplication rate, while '2103' gave the best results on media containing benzyladenine. Applying benzyladenine riboside in 0.8 mg l⁻¹ concentration resulted in the most newly developed shoots of 'SzB-0210'. The longest shoots developed on media with benzyladenine riboside (0.8 mg l⁻¹) in '2013', while medium containing meta-topolin resulted in the longest shoot in other lines. Low rate of callus development was detected on all media. The rate of hyperhydrated shoots was very low in '2106', there was no hyperhydration in '2013' on medium with benzyladenine riboside (0.8 mg l⁻¹).

Keywords: salt content, benzyladenine, benzyladenine riboside, meta-topolin

T1.6 Effects of aromatic cytokinins on *in vitro* shoot multiplication in apple cv. 'Royal Gala'

Judit Dobránszki*, Katalin Magyar-Tábori, Ildikó Hudák

Research Institute of Nyíregyháza, Centre for Agricultural Sciences and Engineering, University of Debrecen, H-4400 Nyíregyháza, Westsik V. u. 4-6., Hungary, *e-mail: dobranszki@freemail.hu

The production of healthy, disease-free plants and the rapid multiplication in apple is based on micropropagation of scions and rootstocks. Successful shoot multiplication using pre-existing meristems of nodal segments is influenced by several internal and external factors but depends mainly on cytokinin content of the medium. In the present experiments *in vitro* shoots of apple scion