

NOTA TÉCNICA

REGENERACIÓN *IN VITRO* DE ONCE CULTIVARES DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES¹

César Vences-Contreras², Luis Miguel Vázquez-García², Ofelia Adriana Hernández-Rodríguez³

RESUMEN

Regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemos apicales. Con el objetivo de inducir la regeneración de plántulas *in vitro* de 11 cultivares regionales de crisantemo, se realizó un ensayo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México en el periodo 2005-2006. Se sembraron meristemos apicales de cada variedad en el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962, más 3 % de sacarosa, 6,5 g/l de agar y un pH de 5,7-5,8. Se evaluaron doce combinaciones posibles producto de cuatro dosis de ANA (0,01; 0,02; 0,03 y 0,04 mg/l) por tres dosis de K (0,5; 1,0 y 1,5 mg/l). La tasa de multiplicación varió de 1:8 hasta 1:29 dependiendo del cultivar.

Palabras clave: Micropropagación, organogénesis, hormonas, regeneración de plantas, meristemo apical.

ABSTRACT

***In vitro* regeneration of eleven cultivars of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using apical meristems.** With the objective to induce the regeneration of plantlets *in vitro* of 11 cultivars of chrysanthemum, an experiment was carried out at Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales of the Facultad de Ciencias Agrícolas of the Universidad Autónoma del Estado de México, in the 2005-2006 period. Apical meristem of each variety were sown in the medium of culture Murashige and Skoog (1962), plus 3 % of sucrose, 6.5 g/l of agar and a pH of 5.7-5.8. Twelve combinations were evaluated result of four doses of ANA (0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 mg/l) and three doses of K (0.5, 1.0 and 1.5 mg/l). The rate of multiplication varied of 1:8 to 1:29 depending on the to cultivar.

Key words: Micropropagation, organogenesis, hormones, plant regeneration, apical meristem.



INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) es una de las flores cultivadas más antiguas

para maceta y flor cortada con alta demanda en el mercado, la variación del color de la flor es su máxima atracción (Otaola *et al.* 2001, Enríquez *et al.* 2005). Su producción para flor de corte, requiere de la provisión continua, en tiempo y forma, de material

¹ Recibido: 13 de diciembre, 2006. Aceptado: 16 de noviembre, 2009. Tesis doctoral del primer autor. Universidad Autónoma del Estado de México.

² Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México, C.P. 50000 Toluca, México. cvencesc@uaemex.mx; lmyg@uaemex.mx

³ Facultad de Ciencias Agrotecnológicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Ciudad Universitaria s/n Campus 1. Chihuahua, Chih. C.P. 31310 A.P. 24. aernande@uach.mx

inicial, de excelente calidad fisiológica y sanitaria (Dole y Wilkins 1999, Fernández *et al.* 2007).

Las plantas se propagan vegetativamente de manera convencional, mediante esquejes homogéneos en consistencia y tamaño, que se extraen de plantas que se mantienen en desarrollo vegetativo, a los cuales se les aplica en su extremo basal una sustancia promotora del enraizado antes de ser establecidos en sustratos ligeros con buen drenaje y aireación en invernadero o cubiertas plásticas (Enríquez *et al.* 2005).

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).

Una forma de evitar tales problemas fitosanitarios es la propagación de crisantemo mediante cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos. Dicha forma de propagación es eficiente para recuperar clones libres de patógenos específicos, y conveniente para producir plantas madre (Enríquez *et al.* 2005) con una genética seleccionada por sus cualidades estéticas y productivas (Dole y Wilkins 1999, Pedraza *et al.* 2001). La regeneración de crisantemo por cultivo de tejidos en diferentes variedades, se ha logrado al utilizar medios basales, diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones, aditivos como antioxidantes y otros. La organogénesis se desarrolla a partir de una gran variedad de explantes como tallos (nodal e internodal), yemas axilares, hojas, ápices o meristemas apicales, protoplastos, raíces, pedicelos y floretes (Mandal *et al.* 2000, Valle *et al.* 2008).

Aún cuando protocolos eficientes de regeneración se han establecido para distintas variedades, pero difíciles de adaptar directamente a otras variedades (Teixeira 2003), es necesario desarrollar protocolos específicos para cada variedad y tipo de explante.

El objetivo de este trabajo es inducir la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de la siembra de meristemas apicales de once variedades de crisantemo comercialmente importantes en la zona de Villa Guerrero, Estado de México, y determinar el medio de cultivo óptimo (en cuanto a la concentración de reguladores de crecimiento) y la máxima tasa de multiplicación por cada una de ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en Toluca, México en el periodo 2005-2006. La Facultad se localiza geográficamente a los 19°14' latitud norte y 92°42' longitud oeste, a una altitud de 2,611 msnm (García 1988).

Se emplearon 11 de las variedades de crisantemo (*D. grandiflora* Tzvelev.) más cultivadas comercialmente en la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México (Cuadro 1). Se usaron esquejes de 10 cm de longitud. Se eliminaron hojas y parte inferior del tallo hasta obtener ápices de 3 cm de longitud, se envolvieron en un trozo de gasa, se amarraron y después se lavaron con agua y jabón (detergente) en un vaso de precipitado durante tres minutos. Luego se sumergieron en una solución de etanol al 70 % por 30 segundos. Transcurrido este tiempo se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante quince minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Los ápices se colocaron en una caja petri, y se procedió al aislamiento y corte del meristemo con la ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumental de disección. Al momento de la siembra se colocó un meristemo apical por cada tubo de ensaye con rosca de 10 x 1,2 cm con 10 ml de medio de cultivo. Luego, los tubos se llevaron a un cuarto de incubación a una temperatura promedio de 25 ± 2 °C, con un periodo de 16 horas luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) y ocho horas de oscuridad (Enríquez *et al.* 2005).

Para la preparación del medio de cultivo se tomó como base las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), 0,4 mg/l de tiamina-HCl, 100 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarosa y 6,5 g/l de agar. El pH fue ajustado a 5,7 – 5,8 (Enríquez *et al.* 2005). Se evaluaron doce tratamientos producto de la combinación de cuatro niveles de concentración de Ácido Naftalenacético (ANA) (0,01; 0,02; 0,03 y 0,04 mg/l) y 3 de Kinetina (K) (0,5; 1,0 y 1,5 mg/l).

Se evaluó el número de brotes, número de hojas por brote y longitud de tallos, a los treinta días después de la siembra (Annadane *et al.* 2000). La tasa de multiplicación se obtuvo dividiendo el número de tallos finales (mes) entre el número de tallos iniciales, tomados durante tres periodos de multiplicación. Las

Cuadro 1. Características generales de las variedades regionales de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) empleadas en la siembra de meristemo apical *in vitro*. Toluca, México. 2005-2006.

Tipo de flor	Nombre regional	Color de la flor	Días a floración	Demanda en el mercado
Eleonora	Eleonora	Amarilla	120	Media
	Eleonora	Blanca	120	Alta
Estandar	Indianápolis	Blanca	100	Media
Margarita	Margarita	Coral	120	Media
	Margarita	Ocre	120	Media
	Margarita	Roja	120	Media
Polar	Polaris white	Blanco	90	Alta
Puma	Puma	Amarillo	110	Alta
	Puma	Blanco	110	Alta
Spider	Spider	Blanco	120	Alta
Vikingo	Vikingo	Blanco	110	Media

Fuente: ICAMEX-Unión Regional de Productores de Totolmajac, Villa Guerrero, México. 2004.

multiplicaciones se realizaron cada 30 días cortando las secciones internodales de los tallos con una yema axilar para ser transplantados a medio fresco. Los datos se analizaron a través del análisis de varianza basado en un diseño experimental completamente al azar y se utilizó el procedimiento de Tukey para la comparación de medias de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de brotes

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas, al 1 % de probabilidad, entre tratamientos en las variedades: Eleonora Amarilla, Indianápolis Blanco, Margarita Ocre, Puma Amarillo, Puma Blanco, Spider Blanco y Vikingo Amarillo (Cuadro 2a). Diferencias estadísticas significativas, al 5 % de probabilidad, se presentaron en la variedad Eleonora Blanca y sin diferencias estadísticas las variedades Margarita Coral y Polar Blanco (Cuadro 2b). El número de brotes adventicios generados varió de 0 a 4, en las distintas variedades dependiendo de la concentración de reguladores del crecimiento. En general, los mejores resultados se presentaron en los

tratamientos cuyo medio de cultivo estuvo compuesto por 1,5 mg/l de K y 0,03 mg/l de ANA.

Longitud de tallo

La longitud de los tallos varió desde los 0 cm a los 5,9 cm en las distintas variedades, los mejores resultados se obtuvieron con 0,5 mg/l de K y los tratamientos que contenían ANA en las concentraciones de 0,02 y 0,03 mg/l. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas, al 1 % de probabilidad, entre tratamientos en las variedades: Eleonora Amarilla, Indianápolis Blanco, Margarita Coral, Margarita Ocre, Margarita Roja, Polar Blanco, Puma Amarillo, Puma Blanco y Spider Blanco. Diferencias estadísticas significativas, al 5 % de probabilidad, se presentaron en la variedad Eleonora Blanca (Cuadro 2a y 2b).

Número de hojas por brote

El número de hojas por brote, varió de 0 a 17,2. Los tratamientos adicionados con 1,0 mg/l de K y los que contenían 0,02 y 0,03 mg/l de ANA presentaron las mejores respuestas. Hubo diferencias altamente significativas, al 1 % de probabilidad, entre tratamientos en las variedades: Indianápolis

Cuadro 2a. Prueba de comparación múltiple de medias por Tukey ($P \leq 0,05$) para el número de brotes adventicios, longitud de tallo y número de hojas por brote en 11 variedades de crisantemo a partir del cultivo *in vitro* de meristemo apical, México 2005-2006.

	TRATAMIENTO											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
K (mg/l)	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
ANA (mg/l)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
Cultivar												
Eleonora amarilla TM=1:11												
Número de brotes	1,20 ab	1,20 ab	1,00 b	1,00 b	0,80 b	0,60 b	1,00 b	2,20 a	1,40 ab	0,60 b	1,00 b	0,80 b
Longitud de tallos	4,66 a	2,91 ab	1,52 ab	1,70 ab	2,74 ab	2,50 ab	4,10 a	3,86 ab	2,90 ab	2,76 ab	0,43 b	1,39 ab
Número de hojas	6,30 a	4,50 a	3,80 a	4,00 a	5,00 a	3,40 a	6,20 a	5,27 a	4,95 a	4,40 a	2,20 a	2,40 a
Indianapolis blanco TM=1:12												
Número de brotes	2,60 a	0,00 c	2,60 a	1,80 ab	1,20 bc	2,00 ab	2,00 ab	1,00 bc	2,80 a	0,00 c	1,00 bc	1,00 bc
Longitud de tallos	0,84 abc	0,00 c	0,53 abc	0,52 abc	0,34 bc	1,25 ab	1,47 a	1,08 ab	0,65 abc	0,00 c	0,33 bc	1,14 ab
Número de hojas	3,93 b	0,00 d	2,90 bc	3,50 b	1,30 cd	6,33 a	4,80 ab	4,20 ab	4,30 ab	0,00 d	3,00 bc	3,20 bc
Margarita ocre TM=1:15												
Número de brotes	1,00 b	0,60 b	0,20 b	1,00 b	2,60 a	0,60 b	1,20 b	0,60 b	0,40 b	0,20 b	1,00 b	0,00 b
Longitud de tallos	0,62 cd	0,40 d	0,16 d	2,54 ab	3,25 a	0,40 d	1,26 bcd	0,23 d	0,35 d	0,16 d	1,76 bc	0,00 d
Número de hojas	1,30 b	1,40 b	1,40 b	2,80 ab	6,13 a	1,20 b	1,80 b	1,00 b	0,60 b	0,80 b	3,60 ab	0,00 b
Puma amarillo TM=1:29												
Número de brotes	2,00 abc	2,80 ab	0,80 c	1,80 bc	2,20 abc	1,20 bc	2,40 abc	1,80 bc	3,60 a	2,60 ab	2,60 ab	1,40 bc
Longitud de tallos	0,38 cd	1,99 a	0,15 d	1,76 ab	1,16 abcd	1,20 abc	0,79 bcd	0,68 cd	1,96 a	1,22 abc	1,34 abc	0,68 cd
Número de hojas	2,30 c	7,70 a	2,70 c	5,50 abc	7,08 ab	2,30 c	2,90 c	3,40 bc	8,08 a	6,23 abc	7,73 a	2,80 c
Puma blanco TM=1:27												
Número de brotes	1,80 c	2,00 bc	3,40 abc	2,75 abc	3,60 abc	4,00 a	3,00 abc	3,40 abc	3,00 abc	3,80 ab	3,00 abc	3,60 abc
Longitud de tallos	0,48 d	0,68 bcd	1,13 abcd	1,55 a	1,36 ab	1,30 abc	1,48 ab	1,20 abc	0,90 bcd	1,40 ab	0,90 bcd	1,14 abcd
Número de hojas	3,60 ef	2,94 f	5,25 cdef	8,46 a	7,07 abcd	6,96 abcd	8,00 ab	7,53 abc	5,74 abcde	7,19 abcd	4,67 def	5,58 bcdef
Spider blanco TM=1:11												
Número de brotes	1,20 abc	0,80 cd	1,40 abc	1,80 ab	1,00 bc	1,20 abc	0,80 cd	1,20 abc	1,00 bc	1,20 abc	2,00 a	0,00 d
Longitud de tallos	1,78 abc	1,30 bcd	0,86 cde	0,78 de	2,38 a	1,26 bcd	0,62 de	1,28 bcd	2,00 ab	1,40 bcd	1,30 bcd	0,00 de
Número de hojas	6,00 ab	5,00 ab	4,40 b	4,60 ab	8,60 a	4,60 ab	3,60 bc	5,20 ab	6,60 ab	5,60 ab	5,90 ab	0,00 c
Vikingo amarillo TM=1:29												
Número de brotes	0,60 c	1,80 abc	1,40 bc	2,00 abc	2,00 abc	2,40 abc	1,80 abc	2,80 ab	3,80 a	1,20 bc	1,80 abc	2,20 abc
Longitud de tallos	0,94 a	1,26 a	0,94 a	1,30 a	1,43 a	1,58 a	1,09 a	0,92 a	1,73 a	1,94 a	1,83 a	1,10 a
Número de hojas	2,80 a	5,20 a	4,20 a	4,20 a	5,80 a	6,00 a	4,16 a	4,35 a	7,70 a	7,60 a	6,63 a	5,83 a

* Medias con la misma letra no difieren estadísticamente.

TM= Tasa de Multiplicación (Número de tallos finales (mes) / Número de tallos iniciales).

Cuadro 2b. Prueba de comparación múltiple de medias por Tukey ($P \leq 0,05$) para el número de brotes adventicios, longitud de tallo y número de hojas por brote en 11 variedades de crisantemo a partir del cultivo *in vitro* de meristemo apical, México 2005-2006.

	TRATAMIENTO											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
K (mg/l)	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
ANA (mg/l)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
Cultivar												
Eleonora Blanca TM=1:27												
Número de brotes	0,60 ab	0,25 b	1,40 ab	1,20 ab	1,40 ab	1,20 ab	0,60 ab	0,60 ab	1,60 a	1,20 b	1,60 a	1,40 ab
Longitud de tallos	0,58 ab	1,20 ab	0,64 ab	1,94 a	0,54 ab	0,94 ab	0,88 ab	0,90 ab	1,10 ab	0,20 b	1,84 ab	1,34 ab
Número de hojas	4,00 b	3,80 b	5,40 b	10,8 ab	4,40 b	11,2 ab	6,60 ab	7,80 ab	6,40 b	2,00 b	17,2 a	7,00 ab
Margarita Coral TM=1:13												
Número de tallos	1,00 a	1,00 a	1,40 a	1,20 a	1,20 a	1,00 a	1,00 a	1,20 a	0,25 a	1,40 a	1,20 a	1,00 a
Longitud de tallos	5,12 ab	2,82 bcd	1,50 cd	4,61 ab	1,35 cd	2,21 bcd	3,72 abc	5,94 a	1,00 cd	2,54 bcd	3,71 abc	0,24 d
Número de hojas	8,75 abc	6,40 abcd	2,90 bcd	9,20 abc	4,32 abcd	7,90 abcd	10,0 ab	11,0 a	2,50 cd	8,50 abc	8,60 abc	0,60 d
Margarita roja TM=1:26												
Número de brotes	3,60ab	2,80 abc	3,40 abc	1,80 bc	1,80 bc	2,80 abc	1,60 bc	2,60 abc	4,00 a	1,40 c	1,60 bc	4,00 a
Longitud de tallos	1,12 c	2,22 abc	1,51 abc	2,53 abc	2,00 abc	1,90 abc	3,24 a	1,26 bc	1,42 abc	3,11 a	2,98 ab	1,50 abc
Número de hojas	3,33 d	5,60 cd	5,77 bcd	8,32 abc	7,66 bc	7,41 bcd	12,2 a	12,2 a	5,64 cd	9,90 ab	9,80 abc	6,50 bcd
Polar blanco TM=1:8												
Número de brotes	1,00 a	1,20 a	1,40 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
Longitud de tallos	3,64 a	2,76 abc	2,07 bcd	2,00 bcd	3,30 a	2,72 abc	2,9 6ab	2,82 abc	2,20 bcd	1,68 d	2,08 bcd	1,92 cd
Número de hojas	7,00 a	6,70 a	5,80 a	6,20 a	6,40 a	7,00 a	6,60 a	6,80 a	6,60 a	5,80 a	7,20 a	6,20 a

* Medias con la misma letra no difieren estadísticamente.

TM= Tasa de Multiplicación (Número de tallos finales (mes) / Número de tallos iniciales).

Blanco, Margarita Coral, Margarita Ocre, Margarita Roja, Puma Amarillo, Puma Blanco y Spider Blanco. Diferencias estadísticas significativas, al 5 % de probabilidad, se presentaron en la variedad Eleonora Blanca (Cuadro 2).

Tasa de multiplicación

La tasa de multiplicación (TM) varió de acuerdo con el cultivar desde 1:8 hasta 1:29, siendo las variedades más productivas: Puma Amarillo y Vikingo Amarillo (Cuadro 2).

Las diferencias en cuanto a la capacidad de regeneración de las distintas variedades empleadas en este estudio, evidencian la importancia del genotipo en el cultivo *in vitro* y concuerda con los resultados obtenidos en otras investigaciones como la de Hodson de Jaramillo *et al.* (2008), quienes declaran que en muchas especies existe una clara relación entre variedades y éxito de regeneración. Por su parte, Shirasawa *et al.* (2000) y Kim *et al.* (1998) realizaron estudios sobre regeneración de brotes adventicios a partir de explantes de pétalo, segmentos nodales; protoplastos y embriones somáticos. Obtuvieron un amplio rango de respuestas dependiendo de la variedad y tipo de explante. Seetharam *et al.* (2000), regeneraron a través del cultivo de explantes de tallo 19 de 37 cultivares con diferentes respuestas entre ellos, a lo que Avila *et al.* (1998) indican que esta variable es una característica ligada al genotipo.

Diversos estudios han demostrado que no existe una combinación de citocininas y auxinas que sea estandar para todas las variedades de crisantemo, ya que hay una fuerte influencia del genotipo (Teixeira 2003). Santalla *et al.* (1998) reportan que las citocininas inducen organogénesis en cultivo de tejidos en presencia de una auxina y en los casos en que no es necesario el complemento exógeno de auxinas para la división celular, se asume que el sistema las está sintetizando. En ese mismo sentido, Haberer y Kieber (2002) señalan que diversos efectos fisiológicos de las citocininas pueden ser explicados por su interacción bioquímica con las auxinas, considerando que ambos reguladores son mutuamente dependientes. Valle *et al.* (2008) evaluaron 12 combinaciones hormonales en seis variedades de crisantemo y sólo dos de ellas regeneraron brotes adventicios a partir de segmentos internodales.

La regeneración se dio bajo diferentes combinaciones de BAP (2 y 3 mg/l) y AIA (1 y 1,8 mg/l). Karim *et al.* (2003), determinaron que la mejor combinación para crisantemo es de BAP con AIA en una relación cercana 2:1. Estudios realizados por Ledger *et al.* (1991) mostraron que *D. indicum* produjo de uno a dos brotes por explante cuando se cultivaron segmentos de hoja en medio MS con 0,2 mg/l de AIA y 3 ó 5 mg/l de BAP. En contraparte, seis genotipos de *D. morifolium* regeneraron pobremente, con un promedio de 2,5 brotes por explante (Chagas *et al.* 2004). En relación al tipo de explante, los provenientes de tallo han mostrado mayor capacidad de regeneración que los pecíolos y las hojas, en un intervalo de dos a 10 brotes por explante, dependiendo igualmente del genotipo (Teixeira y Fukai 2003).

CONCLUSIONES

Es posible llevar a cabo la micropropagación de diversos cultivares de crisantemo a partir de meristemo apical si se emplea un balance adecuado de reguladores del crecimiento para cada uno de ellos.

Los cultivares de crisantemo estudiados no mostraron dificultades para su producción *in vitro* y pueden micropropagarse fácilmente. La tasa de multiplicación fue una característica varietal.

LITERATURA CITADA

- Annadane, S; Rademaker, W; Ramanna, M; Udayakumar, M; de Jong, J. 2000. Response of stem explants to screening and explant source as basis for methodical advancing of regeneration protocols for chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62:47-55.
- Avila, A; Pereyra, SM; Arguello, JA. 1998. Nitrogen concentration and proportion of NH₄-N affected cultivar response in solid and liquid media. *Hort Science* 33:336-338.
- Chagas, EA; Fraguas, CB; Silva, EF; Pascual, M; Mendonca, V. 2004. Multiplicação *in vitro* de crisantemo cv white polaris. *R. Bras. Agrobiologia*. 10:123-126.
- Dole, JL; Wilkins, HF. 1999. *Floriculture. Principles and species*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 613 p.
- Enríquez, JR; Velásquez, B; Vallejo, AR; Velasco, VA. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora*

- obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(4):337-383.
- Fernández, A; Casanova, A; Jiménez, R; Correa, M; Méndez, M. 2007. Efecto de tipos de bandejas y sustratos en la propagación de esquejes y la floración del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cultivar "polaris". *Temas de Ciencia y Tecnología* 11(33):65-69.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 4 ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, DF. 219 p.
- Haberer, G; Kieber, J. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology* 128:354-362.
- Hodson de Jaramillo, E; Forero, A; Cancino, G; Moreno, AM; Monsalve, LE; Acer, W. 2008. *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) varieties "vía" organogenesis and somatic embryogenesis. *Universitas Scientiarum* 13(2):118-127.
- Karim, MZ; Amin, MM; Azad, MAK; Begum, F; Rahman, MM; Islam, MM; Alam, R. 2003. Effects of different plant growth regulator on *in vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. *OnLine J. Biol. Sci.* 3:553-560.
- Kim, J; Park, Y; Jung, S; Chung, H; Shin, S; Sheop, J. 1998. Transformation of chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens* with three vectors. *Journal Korea Society for Horticultural Science* 39:360-6.
- Ledger, SE; Delores, SC; Given, NK. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of Chrysanthemum. *Plant Cell Rep.* 10:195-199.
- Mandal, AKA; Chakrabarty, D; Datta, S. 2000. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:33-38.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Olivera, VZ; Gutiérrez, MA; Gutiérrez, JA; Andrade, M. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12(3):75-80.
- Otahola, V; Aray, M; Yira, A. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. *Revista UDO Agrícola* 1(1):56-63.
- Pedraza, M; Jaen, D; Gutiérrez, A; Colinas, T; López, C. 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de gerbera inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. *Agrociencia* 35:149-158.
- Santalla MJ; Power JB; Davey, MR. 1998. Efficient *in vitro* shoot regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Euphytica* 102: 195-202.
- Seetharam, A; Rademaker, W; Ramanna, M; Udayakumar, M; de Jong, J. 2000. Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62:47-55.
- Shirasawa, N; Iwai, T; Nakamura, S; Honkura, R. 2000. Transformation and transgene expression of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura). *Bulletin of Miyagi Prefecture Agriculture Research Center* 67:15-20.
- Teixeira, SJA. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue cultura, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21:715-766.
- Teixeira, SJA; Fukai, S. 2003. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. *Asian J. Plant Sci.* 2:505-514.
- Valle, SMR; Mascorro, GJO; Gil, VI. 2008. Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema X Grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo* 24(3):219-227.

