

## REGENERACIÓN DIRECTA *IN VITRO* DEL CRISANTEMO, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO

### Direct *in vitro* regeneration of the chrysanthemum, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, from stem segments

MR Valle-Sandoval ✉, JO Mascorro-Gallardo, I Gil-Vázquez, G Iturriaga-de la Fuente

(MRVS) Posgrado de Horticultura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México, 56230. México. vallerocio2000@yahoo.com.mx

(JOMG) Programa de Investigación en Biotecnología Agrícola y Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México

(IGV) Laboratorio de cultivo de tejidos, AGRIBOT. Universidad Autónoma Chapingo. México

(GIF) Departamento de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México

**Artículo recibido:** 22 de octubre 2007, **aceptado:** 4 agosto 2008

**RESUMEN.** Para la aplicación de la biotecnología moderna en un programa de mejoramiento es indispensable contar con un sistema de regeneración *in vitro* eficiente. Se desarrolló un protocolo reproducible y efectivo, en cuanto a la obtención de más brotes por explante, de regeneración por organogénesis directa, para dos variedades de crisantemo (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) Indianápolis y Texana, las cuales son comercialmente importantes en la región de Texcoco, Estado de México. Se evaluó el efecto del tipo de explante (hoja o tallo), distintos niveles y combinaciones de las auxinas ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) y la citocinina benzilaminopurina (BAP). La variedad Indianápolis mostró un mayor porcentaje de brotes por explante en medio de Murashige y Skoog (MS) con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA. En cambio, la variedad Texana requirió 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1.8 mg L<sup>-1</sup> de AIA. En ambas variedades el alargamiento de los brotes y la inducción de raíces se obtuvo en el medio MS al 100 y 50 % de sus sales y sin hormonas.

**Palabras clave:** *Dendranthema X grandiflorum*, cultivo *in vitro*, regeneración de plantas, organogénesis.

**ABSTRACT.** An efficient *in vitro* regeneration system is required in order to be able to apply modern biotechnology to breeding programmes. A protocol that was effective and reproducible with respect to the number of shoots per explant, was developed for regeneration by direct organogenesis for the two chrysanthemum varieties Indianapolis and Texana (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) that are commercially important in the region of Texcoco, state of Mexico. The effects of the type of explant (leaf or stem), of different levels and combinations of the auxins naftalenacetic acid (ANA) and indolacetic acid (IAA), and of the cytokinin benzylaminopurine (BAP) were evaluated. The Indianapolis variety grew a greater percentage of shoots per explant in the Murashige Skoog medium (MS) with 2 mg L<sup>-1</sup> BAP and 1 mg L<sup>-1</sup> IAA, while the Texana variety required 3 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 1.8 mg L<sup>-1</sup> of IAA. In both varieties the lengthening of the shoots and the induction of the roots were obtained in the MS medium with 100 and 50 % of the salts and without hormones.

**Key words:** *Dendranthema X grandiflorum*, *in vitro* culture, regeneration of plants, organogenesis.

## INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) se encuentra entre los tres cultivos ornamentales más importantes a nivel mundial, con un enorme valor económico y cultural (Boase *et al.*, 1997).

Las variedades comerciales se propagan vegetativamente por esquejes y estaquillas o *in vitro*, a partir de meristemas para obtener plantas sanas. La organogénesis es un proceso que comprende el desarrollo de vástagos o raíces directamente de los explantes o a partir de un callo desarrollado previamente (rege-

neración indirecta). Murashige (1974) y Narayanaswamy (1977) describieron los factores relacionados con el explante (edad fisiológica y ontogénica, el tamaño y el tejido u órgano del que es extraído) y con la planta madre (estado fisiológico) que depende de la época del año en que se realiza el cultivo. Estos factores deben ser considerados para la inducción exitosa de la organogénesis. La regeneración de crisantemo por cultivo de tejidos en diferentes variedades, se ha logrado al utilizar medios basales, diferentes reguladores de 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. Teixeira (2003) en su amplia revisión resaltó la importancia de esta tecnología para efectos de un programa de mejoramiento, que tenga como objetivo obtener plantas con nuevas características mediante ingeniería genética. La regeneración indirecta de brotes adventicios vía callo fue obtenida a partir de tallo, pétalo y ápice, sin embargo, este tipo de regeneración puede resultar en variantes somaclonales y la formación de quimeras, mientras que la regeneración directa de hoja y tallo puede eliminar tales efectos (Teixeira 2003). El cultivo de *Chrysanthemum morifolium*, ha permitido inducir una gran variación somaclonal (Pillai & Zulkifli 2000). Generalmente el tallo ha mostrado mayor capacidad de regeneración que la hoja (Gao et al. 2001).

Aún cuando protocolos eficientes de regeneración se han establecido para distintas variedades, se destaca que estos son genotipo dependientes y difíciles de adaptar directamente a otras variedades (Teixeira 2003), por lo que, para desarrollar un protocolo de transformación genética se debe establecer primero un sistema de regeneración que produzca un mayor porcentaje de formación de brotes de la variedad que se pretende manipular mediante esta tecnología. En este marco de referencia el objetivo principal fue desarrollar una nueva variedad de crisantemo mediante ingeniería genética, para lo cual en el presente trabajo se planteó determinar las condiciones óptimas para regenerar *in vitro* plantas de distintas variedades de crisantemo cultivadas co-

mercialmente en el municipio de Texcoco, Estado de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los esquejes de crisantemo sin enraizar de tres semanas de edad fueron de las variedades: Indíanápolis, Texana, Puma, Shosmy, Eleonora y Hartmann. Los esquejes crecieron en condiciones de invernadero, durante los meses de octubre a marzo. Las hojas fueron cuidadosamente eliminadas para evitar daño en la epidermis del tallo. Después, los tallos fueron desinfectados en una solución de detergente al 3% (p/v) durante tres minutos, etanol al 70% (v/v) durante un minuto, 10 minutos con una solución 1.5% de cloro activo (Cloralex®) y 0.5 ml de Tween 20. Finalmente, los tallos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. Posterior a la desinfección, a partir de los tallos se cortaron secciones internodales aproximadamente de 2 mm de longitud, las cuales fueron divididas en sección del área apical, media y basal para conservar la polaridad de los explantes. También, de los fragmentos de hoja se evaluó la respuesta morfogénica para determinar el efecto del explante en la organogénesis.

### Medios de cultivo y condiciones experimentales

Los explantes fueron cultivados en el medio basal de Murashige & Skoog (1962), con 3% de sacarosa y 0.6% de agar. El medio fue suplementado con las hormonas 6-bencilaminopurina-HCl (BAP) (SIGMA, ALDRICH) (2.0 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>), ácido indolacético (AIA) (SIGMA, ALDRICH) (0.1 a 1.8 mg L<sup>-1</sup>) y ácido naftalenacético (ANA) (SIGMA, ALDRICH) (0.1 a 1.0 mg L<sup>-1</sup>). Con los explantes fueron establecidos 12 tratamientos para las seis variedades y ocho tratamientos adicionales para Texana. Los cultivos se mantuvieron bajo un intervalo de temperatura de 24 y 32 °C, 16 horas de fotoperíodo y una intensidad luminosa de 96 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (lámparas fluorescentes de 30 W). El cultivo *in vitro* constó de las fases de: inducción de brotes, subcultivo, alargamiento de brotes y enraizamiento. En la fase de inducción, los explantes se sembraron en ca-

jas Petri, la polaridad de los fragmentos internodales de tallo se conservó y los fragmentos de hoja con el haz en contacto se colocaron con el medio de cultivo. El subcultivo de los explantes se desarrolló en frascos de 125 ml con un volumen de 25 ml de medio. La fase de alargamiento fue en frascos de 250 ml con un volumen de 30 ml de medio. Posteriormente, los brotes se colocaron en el medio MS basal al 50 % de su sales, 1.5 % de sacarosa y 0.6 % de agar para la formación de raíces.

### Aclimatización en invernadero

El agar fue cuidadosamente eliminado de los brotes enraizados. Posteriormente, los brotes fueron transferidos a charolas que contenían Peat moss (Premier®) como sustrato, el cual fue desinfectado con una solución con 0.1 % (p/v) de Tecto 60® (Ingrediente activo Tiabendazol 60 %) y 0.1 % (p/v) de Fungimycin® agrícola (ingredientes activos 18.1 % p/v de estreptomycin y 2 % p/v de oxitetraciclina). Las charolas se cubrieron con domos de plástico para mantener la humedad relativa. Las plantas de 12 cm de longitud fueron replantadas en macetas y se expusieron a dos horas de luz artificial de  $320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (focos de 100 W) durante la noche. Las plantas fueron fertilizadas con una solución nutritiva que contenía en  $\text{mg L}^{-1}$  los siguientes nutrientes: N = 250, P = 60, K = 250, Ca = 300, S = 200, Mg = 75, Fe = 3, Mn = 0.5, B = 0.5, Cu = 0.1 y Zn = 0.1. Las fuentes empleadas fueron fertilizantes comerciales (nitrato de calcio, sulfato de potasio, fosfato monoamónico, sulfato de magnesio, sulfato ferroso, ortoborato de sodio, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y sulfato de zinc) diluidos en agua.

### Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se usó un diseño completamente aleatorizado, el cual constó de dos repeticiones por la cantidad de tratamientos a evaluar. Una caja Petri con 15 explantes fue considerada como una repetición. Las variables evaluadas fueron porcentaje de explantes con brotes (% B) y el número de brotes (NB) formados por explante a los 45 días. La variable % B fue analizada mediante pruebas de comparación de dos proporciones binomiales por pares de tratamiento (Infante & Zárate 1984).

La variable NB se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal & Wallis, debido a que la distribución de los datos no fue normal (Infante & Zárate 1984). Esta prueba se basa en la asignación de intervalos para comparar muestras independientes, con ajustes por empates bajo un diseño experimental completamente al azar. Posterior a la asignación de los intervalos se efectuó la comparación múltiple de cada intervalo asignado basado en la suma de promedios (Conover 1980).

## RESULTADOS

### Respuesta de las seis variedades a las combinaciones hormonales

De las seis variedades de crisantemo evaluadas con 12 combinaciones hormonales, únicamente las variedades Indianápolis y Texana regeneraron en brotes adventicios, a partir de segmentos internodales de tallo. Ambas variedades, que si regeneraron, lo hicieron bajo diferentes combinaciones de BAP ( $2 \text{ mg L}^{-1}$  y  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) y AIA ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1.8 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Los explantes de las variedades que no regeneraron brotes, solamente formaron un callo somero de color amarillo y se oxidaron durante el cultivo. El 80 % de las secciones de tallo cercanas al ápice se oxidaron. Asimismo, el porcentaje de regeneración fue menor en la zona apical, por lo que se consideró tomar únicamente las secciones de tallo tomadas de la parte media.

Al comparar la capacidad de regeneración de los explantes que proceden de hoja y tallo, en éstos últimos se observó oxidación de los tejidos, mayor formación de callo y no se obtuvieron brotes.

### Regeneración eficiente de la variedad Indianápolis

De las combinaciones hormonales probadas, únicamente con las concentraciones de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  y  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP con las tres concentraciones de AIA, se obtuvieron brotes en los diferentes porcentajes que fluctuaron entre 11 y 55 %. El porcentaje de explantes con brotes (% B) no resultó significativamente diferente en los cinco tratamientos. Tampoco, el número de brotes en los tratamientos que

**Tabla 1.** Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad Indianápolis. En la columna % B (proporciones) los valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial. En la columna NB (rangos) los valores con la misma letra son iguales en la misma columna de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de rangos a una  $p \leq 0.05$ .

**Table 1.** Multiple range comparisons to determine the effect of treatments on the percentage of explants with shoots and the number of shoots per explant of the Indianapolis variety chrysanthemum. In column % B (proportions), the values with the same letter within each column indicate statistically equal proportions according to the hypothesis tests on the p parameters of the binomial distribution. In column NB (ranges), the values with the same letter are equal in the same column in agreement with the multiple range comparison test at  $p \leq 0.05$ .

Tratamientos		Por ciento de explantes con brotes (% B)	No. de brotes por explante (NB)	(% B) proporciones	(NB) rangos
BAP (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )				
2	0.5	44	2.4	0.51 <sup>a</sup>	683 <sup>a</sup>
2	1.0	55	2.4	0.71 <sup>a</sup>	777 <sup>a</sup>
3	0.1	11	0.4	0.37 <sup>a</sup>	429 <sup>b</sup>
3	0.5	50	1.8	0.35 <sup>a</sup>	671 <sup>a</sup>
3	1.0	28	1.6	0.14 <sup>a</sup>	653 <sup>ab</sup>

contenían 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP con 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA resultaron con diferencias significativas. Las cinco combinaciones tuvieron en común la presencia de AIA. Aún cuando los resultados estadísticos no mostraron diferencias claras, los datos promedios permitieron establecer que la combinación de BAP/AIA (2:1) fue la que dio mejor respuesta en cuanto al porcentaje de explantes con brotes (55 %) y número de brotes por explante (2.4) en comparación con las otras combinaciones. Además, los brotes formados en este tratamiento mostraron una morfología más uniforme (Tabla 1).

Durante el proceso de regeneración los explantes mostraron una serie de cambios. Los primeros cambios morfogénicos ocurrieron después de una semana de cultivo y se manifestó con el crecimiento del explante, una coloración verde y la formación de callo en la zona superior del explante que no estuvo en contacto con el medio. Después de dos a tres semanas, los primeros brotes se formaron directamente de la zona no diferenciada de los explantes. Posteriormente, el alargamiento y diferenciación continuó hasta que después de 30 o 35 días, los brotes con hojas en desarrollo se observaron (Figura 1). Una vez que se estableció la fase de inducción, se hizo un subcultivo con el mismo medio de inducción, ya que esto permitió que hubiera un mayor número de brotes y a su vez lo brotes alcanzaran un tamaño y vigor adecuados.

La fase de aclimatización *ex vitro*, es una fase

crítica en el cultivo *in vitro*. Para el caso del crisantemo, utilizar como sustrato Peat moss combinado con alta humedad relativa y la exposición de las plantas a dos horas diarias de la luz (durante la noche) por tres semanas (21 días) permitió que las plantas se desarrollaran adecuadamente hasta una altura de 12 cm, cuando se transfirieron a macetas. Cuando las plantas tuvieron una altura de 20 cm se retiró la luz por la noche para inducir la floración y a las dos semanas, se observaron los primeros botones florales y posteriormente a las dos semanas las flores. En el presente trabajo y para el caso de la variedad Indianápolis, el tiempo para regenerar plantas completas a partir de segmentos de tallo y llevarlas hasta floración requirió de 17 semanas o 119 días (Figura 1).

### Regeneración eficiente de la variedad Texana

En una primera etapa, cuando fueron probados los doce tratamientos, esta variedad mostró una respuesta muy baja, ya que se obtuvieron en promedio de uno a tres brotes por explante en el 20 % de los mismos, con la combinación hormonal de 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Partiendo de este resultado y para mejorar la respuesta se probaron otras combinaciones hormonales (Tabla 2).

En cinco tratamientos se obtuvo respuesta. La mejor la combinación fue en 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1.8 mg L<sup>-1</sup> de AIA, bajo la cual se logró un 80 % de explantes con brotes (Tabla 2). Al igual que la

**Tabla 2.** Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad Texana. En la columna % B (proporciones) los valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial. En la columna NB (rangos) los valores con la misma letra son iguales en la misma columna de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de rangos a una  $p \leq 0.05$ .

**Table 2.** Multiple range comparisons to determine the effect of treatments on the percentage of explants with shoots and the number of shoots per explant of the Texana variety chrysanthemum. In column % B (proportions), the values with the same letter within each column indicate statistically equal proportions according to the hypothesis tests on the p parameters of the binomial distribution. In column NB (ranges), the values with the same letter are equal in the same column in agreement with the multiple range comparison test at  $p \leq 0.05$ .

Tratamientos		Por ciento de explantes con brotes (% B)	No. de brotes por explante (NB)	(% B) proporciones	(NB) rangos
BAP (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )				
3	1.0	20	0.2	0.20 <sup>c</sup>	115 <sup>c</sup>
3	1.2	20	0.3	0.30 <sup>c</sup>	121 <sup>c</sup>
3	1.4	40	0.8	0.80 <sup>b</sup>	163 <sup>b</sup>
3	1.6	80	2.8	2.80 <sup>a</sup>	295 <sup>a</sup>
3	1.8	80	4.1	3.60 <sup>a</sup>	340 <sup>a</sup>

variedad Indianápolis fue necesaria una relación de BAP/AIA cercana a 2:1 para lograr la emisión de brotes. En la variedad Texana se hicieron dos subcultivos de dos semanas cada uno para inducir una mayor cantidad de brotes por explante (2.4 en Indianápolis contra 4.1 en Texana).

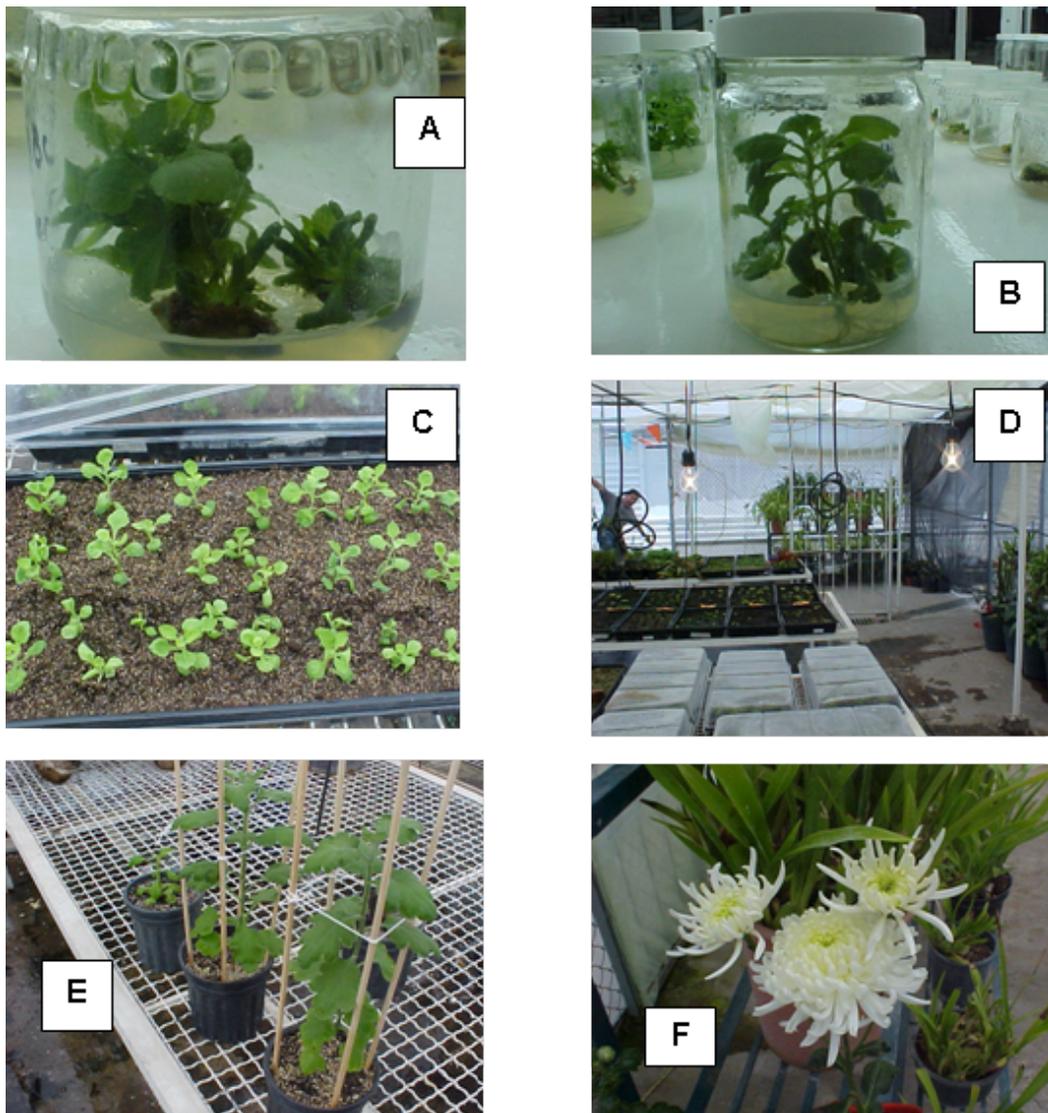
Los brotes diferenciados fueron más pequeños y menos vigorosos que los de la variedad Indianápolis. Además, una semana más fue requerida para que las plantas regeneradas alcanzaran el tamaño óptimo (12 cm) para transferirse al suelo y crecer en el invernadero (Figura 2). Sin embargo, una vez en maceta mostraron un crecimiento con hojas mucho más grandes y verdes, comparadas con las de la variedad Indianápolis. También, la floración fue más rápida que la variedad Indianápolis. Una semana después de quitar la luz nocturna fue posible observar los botones florales y las flores se obtuvieron en tres semanas. Desde la siembra de los segmentos de tallo hasta la floración, Texana requirió de 18 semanas o 126 días (Figura 2), el cual resultó mayor tiempo del invertido para Indianápolis.

## DISCUSIÓN

Las diferencias en cuanto a la capacidad de regeneración de la variedad Indianápolis y Texana concordó con los resultados obtenidos con otras variedades (Teixeira 2003), en los cuales se ha determinado que las citocininas y auxinas jugaron un papel importante en la obtención de brotes. Diversos estu-

dios han demostrado que no existe una combinación de BAP con AIA o ANA que sea estándar para todas las variedades de crisantemo, ya que hay una fuerte influencia del genotipo (Teixeira 2003). Para el crisantemo se determinó que la mejor combinación fue BAP con AIA en una relación cercana 2:1 (Karim *et al.* 2003). Los estudios realizados mostraron que *D. indicum* produjo uno a dos brotes por explante cuando se cultivaron segmentos de hoja en medio MS con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 3 ó 5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Ledger *et al.* 1991). En cambio, seis genotipos de *D. morifolium* regeneraron pobremente, con un promedio de sólo 2.5 brotes por explante (Chagas *et al.* 2004). De 11 variedades de *D. morifolium*, solamente ocho produjeron brotes en un medio que contenía 1 mg L<sup>-1</sup> de NAA y 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Kaul *et al.* 1990). Entonces, la capacidad de regeneración de brotes en crisantemo es genotipo dependiente y ésta ha variado ampliamente de 0 a 90 % de los explantes (Teixeira 2003).

Lu *et al.* (1990) seccionaron segmentos de tallo en tres partes, que clasificaron como explante de tipo I (zona apical), tipo II (zona media) y tipo III (zona basal). Ellos determinaron que el explante tipo I fue más efectivo en la formación de brotes, ya que los explantes más cercanos al ápice resultaron más competentes en la regeneración. De igual forma, Rout & Das (1997) establecieron que el potencial morfogenético varió con la etapa de madurez del tallo. En comparación con los datos citados, en la presente investigación obtuvo un mayor por-



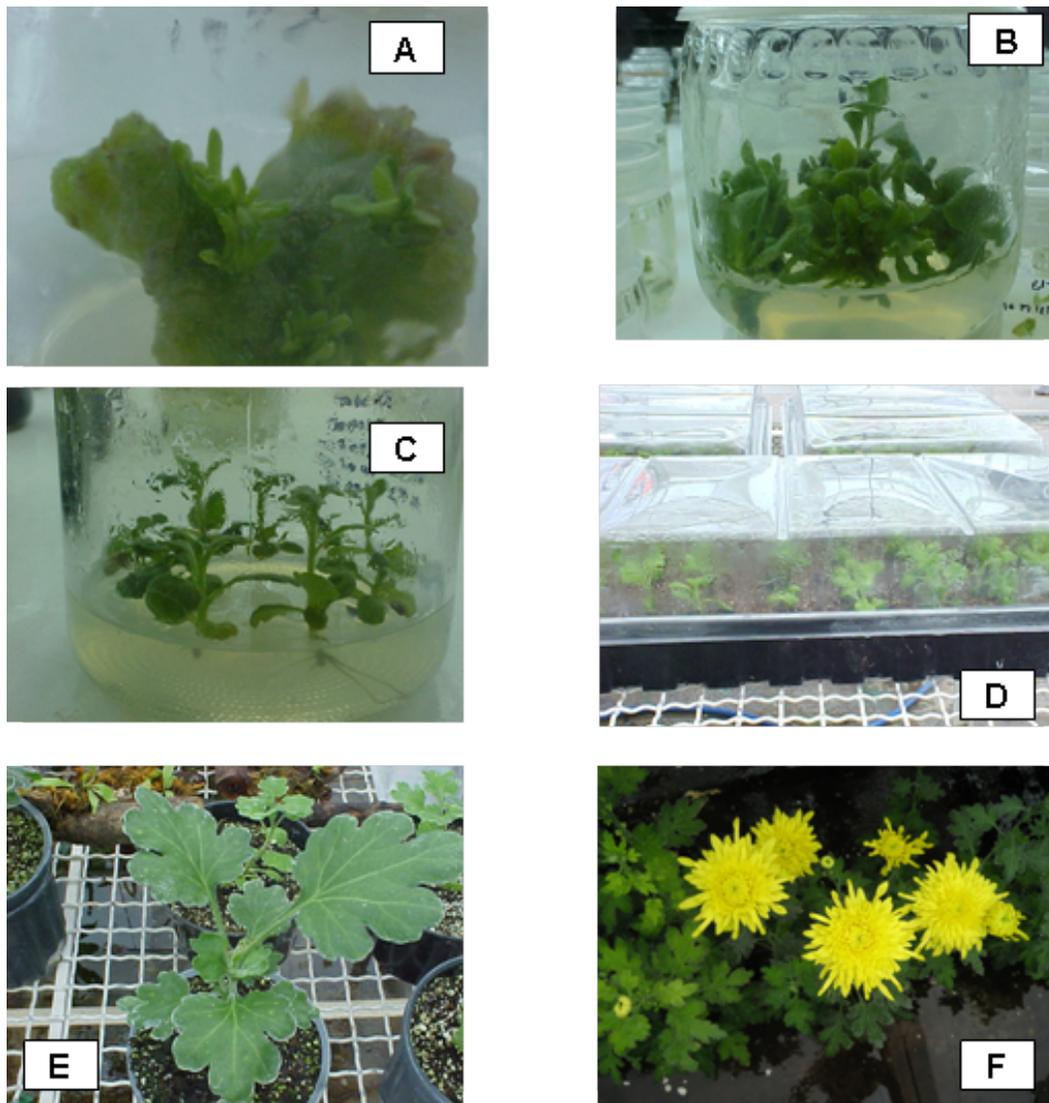
**Figura 1.** (A) Cultivo *in vitro*, después de tres semanas de subcultivo, (B) fase de enraizamiento a las dos semanas cultivo, (C y D) aclimatización en invernadero, (E) transferencia a maceta, (F) plantas de crisantemo variedad Indianápolis en floración después de 17 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo.

**Figure 1.** (A) *In vitro* culture, after three weeks of subculture, (B) rooting phase after two weeks, (C and D) acclimatisation in the greenhouse, (E) transplanting to a pot, (F) flowering plants of Indianapolis variety chrysanthemum after 17 weeks of growth from stem segments.

centaje de respuesta al cultivar segmentos tomados de la porción media del tallo, pero no con los segmentos obtenidos cerca del ápice. Los segmentos cortados cerca del ápice fueron más pequeños y se oxidaron fácilmente, mientras que los de la base, aún cuando fueron de mayor tamaño, regeneraron pobremente debido probablemente a que los tejidos eran más viejos. Lu *et al.* (1990) establecieron que

en el crisantemo existe un gradiente de etapas de desarrollo en el tallo, lo que determina que sea crítico seleccionar la etapa más adecuada del explante para asegurar un alto porcentaje de regeneración.

En relación al tipo de explante, Gao *et al.* (2001) y Himstedt & Jacobsen (2001) compararon la capacidad morfogenética de hoja y tallo, y encontraron una mayor capacidad de regeneración



**Figura 2.** (A) Cultivo *in vitro*, después de dos semanas, (B) fase de alargamiento a las dos semanas, (C) fase de enraizamiento, (D) aclimatización en invernadero, (E) transferencia en maceta y (F) plantas de crisantemo variedad Texana con flores después de 18 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo.

**Figure 2.** (A) *In vitro* culture, after two weeks, (B) elongation phase after two weeks, (C) rooting phase, (D) acclimatization in the greenhouse, (E) transplanting to a pot and (F) flowering plants of Texana variety chrysanthemum after 18 weeks of growth from stem segments.

en tejidos de tallo que de hoja. Los explantes que provinieron de tallo han mostrado mayor capacidad de regeneración que los pecíolos y las hojas, en un intervalo de dos a 10 brotes por explante, lo que depende de igual forma del genotipo (Teixeira & Fukai 2003). Para explicar lo anterior, Kaul *et al.* (1990) determinaron que existen diferentes respuestas de los explantes cortados de tallo y hoja, debido

particularmente a la concentración de auxinas. Kaul *et al.* (1990) explicaron el efecto de los diferentes niveles endógenos de hormonas en los tejidos, lo cual afecta la respuesta a las hormonas aplicadas exógenamente. Aunado a esto, Miyazaki & Tashiro (1978) registraron que los segmentos de tallo de *Chrysanthemum morifolium* cv. Kayono-sakura, obtenidos de plantas jóvenes de nueve semanas, pro-

dujeron brotes adventicios con mayor facilidad que los obtenidos de plantas más viejas (19 semanas). Asimismo, Miyazaki & Tashiro (1978) determinaron que los segmentos provenientes de esquejes crecidos durante el invierno regeneraron más brotes que durante primavera o verano. En el presente trabajo, los mejores porcentajes de brotación se obtuvieron en los meses de otoño e invierno, con lo cual se determinó el efecto de estacionalidad.

El desarrollo de plantas completas de crisantemo, desde los segmentos de tallo para Texana e Indianápolis hasta floración, requirió 119 y 126 días. Lu *et al.* (1990), registraron un período de 15 semanas para la variedad Royal Purple, quienes emplearon los segmentos de tallo para obtener plantas completas a través de regeneración directa. En comparación, un sistema de regeneración que utili-

za como explante los meristemas, la obtención de plantas con flores es de 21 semanas según experiencia de los productores de crisantemo de la región de Texcoco. En invernadero, el tiempo que se requiere para obtener plantas con flores desde esquejes es de 15 semanas, de acuerdo al manejo de los mismos productores de crisantemo de la región.

Con base en la amplia revisión efectuada por Teixeira (2003) no existía información previa en la literatura sobre el manejo exitoso *in vitro* de las variedades Indianápolis y Texana bajo un esquema de regeneración directa a partir de segmentos de tallo. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo será posible el aplicar las técnicas de transformación genética para incorporar nuevas características, como mayor vida postcosecha, resistencia a frío, color y morfología, a estas variedades.

## LITERATURA CITADA

- Boase MR, Miller R, Delores SC (1997) *Chrysanthemum* systematics, genetics and breeding. En: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews. Vol. 14. John Wiley and Sons, New York. 480 pp.
- Chagas EA, Fraguas CB, Silva EF, Pascual M, Mendonça V (2004) Multiplicação *in vitro* de crisantemo cv white polaris. R. Bras. Agrocienca 10: 123-126.
- Conover WJ (1980) Practical nonparametric statistics. John Wiley and Sons. New York. 250 pp.
- Gao Y, Zhao B, Ding G, Zhang Q (2001) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflorum*. J. Beijing Forestry Univ. 23: 32-43.
- Himstedt JP, Jacobsen HJ (2001) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Chrysanthemum* (*Dendranthema X grandiflorum*). Acta Hort. (ISHS) 560: 421-424.
- Infante G, Zárate del GP (1984) Métodos Estadísticos. Editorial Trillas. Distrito Federal, 643 pp.
- 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.
- Kaul V, Miller MR, Hutchison JF, Richards D (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (sin. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). Plant Cell Tissue Organ Cult. 21: 21-30.
- Ledger SE, Delores SC, Given NK (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chrysanthemum*. Plant Cell Rep. 10: 195-199.
- Lu CY, Nugent G, Wardley T (1990) Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cv. Royal Purple) Plant Cell Reports 8: 733-736
- Miyazaki S, Tashiro Y (1978) Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium*. IV. Explant sources for stem segment culture. Agr. Bull. Saga. Univ. 44: 67-78.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-136.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Narayanaswamy S (1977) Regeneration of plants from tissue culture. En: Reinert J, Bajaj YPS (eds) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag. Berlín. 500 pp.
- Pillail V, Zulkifli L (2000) Somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium* generated through petal cultures. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 28: 115-120.
- Rout GR, Das P (1997) Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. *Sci. Hort.* 69: 239-257.
- Teixeira SJA (2003) *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, 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.

