

## Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción de plantas de crisantemo libres de patógenos

### Plant tissue culture applied to the production of pathogen-free chrysanthemum plants

<sup>1</sup>Fátima Manuel-Zárate , <sup>2§</sup>José Raymundo Enríquez-del Valle , <sup>3</sup>Alfonso Vásquez-López , <sup>2</sup>Gerardo Rodríguez-Ortiz , <sup>3</sup>Isidro Morales-García , <sup>2</sup>Yuri Villegas-Aparicio 

<sup>1</sup>Estudiante. <sup>2</sup>Investigador. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO). Santa Cruz Xoxocotlán-Oaxaca. México. <sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca. Santa Cruz Xoxocotlán-Oaxaca. México. <sup>§</sup>Autor de correspondencia: ([jose.ev@voaxaca.tecnm.mx](mailto:jose.ev@voaxaca.tecnm.mx)).

#### Resumen

El cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum × morifolium*) tiene gran importancia económica en México, por su superficie cultivada y volumen de inflorescencias que se comercializan. Las plantas se propagan de forma asexual mediante el enraizado de estacas herbáceas o micropropagación, técnicas que conservan las características genéticas de la planta original seleccionada. Ambos procesos requieren material vegetal inicial de alta calidad fitosanitaria. El esquema de micropropagación para obtener plantas madre (PM) libres de patógenos específicos, combina saneamiento con las etapas de propagación *in vitro*: 1) termoterapia en invernadero; 2) cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos; 3) quimioterapia. Actualmente existen numerosos estudios sobre la propagación *in vitro* de crisantemo que combina datos históricos, normativos y científicos publicados entre 1962 y 2023 que abarca los datos más relevantes, como el tipo de explanto vegetal para iniciar el cultivo *in vitro*, condiciones de medio de cultivo (MC) e incubación y la respuesta obtenida, la adaptación en invernadero de plantas micropropagadas y su establecimiento en suelo para cultivarlas como PM. El diagnóstico y certificación de plantas libres de patógenos son cruciales para garantizar la sanidad vegetal, prevenir la diseminación de enfermedades y cumplir con las regulaciones fitosanitarias nacionales e internacionales. La incorporación del CTV en los esquemas productivos representa una alternativa para mantener y aumentar la competitividad de la floricultura mexicana.

**Palabras clave:** crisantemo, cultivo *in vitro*, esquejes, patógenos, propagación.

#### Abstract

Chrysanthemum (*Chrysanthemum × morifolium*) cultivation is of great economic importance in Mexico, due to its cultivated area and the volume of inflorescences sold. Plants are propagated asexually through rooting herbaceous cuttings or micropropagation, techniques that preserve the genetic characteristics of the selected original plant. Both processes require initial plant material of high phytosanitary quality. The micropropagation scheme for obtaining stock plants (MPs) free of specific pathogens combines sanitation with the following *in vitro* propagation stages: 1) greenhouse thermotherapy; 2) *in vitro* culture of meristematic apices; and 3) chemotherapy. Currently, numerous studies exist on the *in vitro* propagation of chrysanthemums, combining historical, regulatory, and scientific data published between 1962 and 2023. These studies cover the most relevant information, such as the type of plant explant used to initiate *in vitro* culture, culture medium (CM) and incubation conditions, the resulting response, the greenhouse adaptation of micropropagated plants, and their establishment in soil for cultivation as plant material (PM). The diagnosis and certification of pathogen-free plants are crucial to ensuring plant health, preventing the spread of diseases, and complying with national and international phytosanitary regulations. Incorporating plant culture technology (PCT) into production

systems represents an alternative for maintaining and increasing the competitiveness of Mexican floriculture.

**Index words:** chrysanthemum, *in vitro* culture, cuttings, pathogens, propagation.

### Introducción

Los crisantemos (*Chrysanthemum* spp.) son de origen asiático y a nivel mundial pertenecen a una de las cuatro principales especies ornamentales cultivadas para flor de corte. En China se cultivaban hace más de 2500 años, formando un grupo altamente diversificado y siendo la principal flor exportada durante el 2019, con hasta 1911 millones de plantas (Zhou et al., 2023). Es una especie económicamente notable, cubriendo 8475 ha de producción en el año 2013 (Eisa et al., 2022). En Europa, el cultivo de crisantemo para la producción de flores cortadas es una industria altamente rentable, en Italia se ocupan alrededor de 1200 ha para su cultivo, principalmente en invernaderos de alta tecnología (Castello et al., 2022).

En México se encuentran numerosas variedades con diversidad de colores y formas. Existe una demanda constante de nuevas variedades en la industria hortícola dedicada a flores cortadas (Cruz et al., 2016). Durante el año 2012 se registró un área de producción abierta de 2365 ha (Eisa et al., 2022). En 2023, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó que los floricultores mexicanos produjeron 1609 millones de flores de crisantemo, representando el 38.5 % del total nacional. Las principales entidades productoras son el Estado de México con el 94.1 %, Puebla con 4.8 %, Morelos con 0.8 % y el resto del país el 0.3 % (SIAP, 2023). La producción de flor bajo invernadero registró un crecimiento promedio de 99.9 % en el periodo de 2004 a 2010 (Valdez-Aguilar et al., 2015).

El crisantemo es una de las principales flores de corte cultivadas en México, valorada por su gran adaptabilidad a diferentes condiciones agroclimáticas, lo que permite su producción

durante todo el año. Para un óptimo desarrollo requiere temperaturas entre 15 y 27 °C, humedad relativa (*HR*) de 60 a 70 %, suelos porosos con alto contenido de materia orgánica, pH entre 5.5 y 6.5, y la conductividad eléctrica no debe superar los 2.5 mS m<sup>-1</sup>. Sin embargo, cuando la *HR* supera el rango óptimo, se incrementa significativamente el riesgo de diversos problemas fitosanitarios, causadas por hongos, tales como la roya blanca y diversas pudriciones. Por el contrario, niveles bajos provocan alteraciones fisiológicas como acortamiento de tallos, quemaduras foliares y falta de uniformidad en la floración (Linares, 2005).

Los problemas sanitarios ocasionados por diversos agentes fitopatógenos como: hongos, bacterias, virus y viroides, generan síntomas como manchas y defoliación, crecimiento raquítico, disminuyen el valor estético y comercial que afectan la calidad, productividad y valor de las cosechas (García-Velasco et al., 2005). Los crisantemos son altamente susceptibles a contaminantes fúngicos (*Alternaria*, *Fusarium*, roya blanca), bacterianos (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*) y virus del tipo *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Chrysanthemum virus B* (CVB), *Impatiens necrotic virus* (INSV), *Tomato aspermy virus* (TAV) y el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Ram et al., 2009; Kondo et al., 2011).

Uno de los eventos más críticos en la historia de este cultivo en México fue, durante la década de 1990, cuando se presentó la enfermedad de la roya blanca del crisantemo, provocada por *Puccinia horiana* Henn. Esta enfermedad provocó pérdidas económicas a los agricultores, lo que obligó a la implementación de estrictas medidas cuarentenarias y sanitarias en los procedimientos de cultivo (Leyva-Mir et al., 2001). Ante esta situación, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, estableció la campaña de prevención y acción contra la enfermedad, y publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-EM-021-FITO-1994, aplicable en el Estado de México, Morelos y Distrito Federal; así como las medidas preventivas para evitar su diseminación a las zonas productoras de crisantemo libres del patógenos. Actualmente la Norma se canceló, pero el manejo técnico

permanece vigente para asegurar la producción de material vegetal de calidad fitosanitaria y evitar la reintroducción o dispersión del patógeno en las zonas productoras.

A pesar de los avances en el manejo, los problemas fitosanitarios continúan representando una de las principales limitantes para la producción sustentable de crisantemo en México, ya que comprometen la competitividad del sector y generan importantes pérdidas económicas para los productores.

La propagación mediante cultivo de tejidos vegetales (*CTV*) representa una herramienta biotecnológica con importantes ventajas, entre las que destaca la posibilidad de lograr el rejuvenecimiento fisiológico de las plantas, al tiempo que se preservan fielmente las características genéticas de los genotipos seleccionados. Este método minimiza la aparición de mutaciones somáticas y cambios epigenéticos no deseados (González-Rábade et al., 2011).

En diversas especies ornamentales, entre ellas el crisantemo, el *CVT* se ha utilizado ampliamente para renovar y mantener *PM*. Esta técnica ha demostrado ser efectiva para producir material de propagación de alta calidad fitosanitaria y genética (Zalewska et al., 2010; González-Rábade et al., 2011; Azadi et al., 2016; Quiroz et al., 2017; Wang et al., 2020). Desde la década de 1970, las técnicas *CTV* en ocasiones complementadas con otras herramientas biotecnológicas, han encontrado diversas aplicaciones: 1) obtención de organismos genéticamente modificados (*OGM*); mediante la ingeniería genética, con el objetivo de introducir nuevas características de interés (Valle-Sandoval et al., 2008; Delgado-Paredes et al., 2021); 2) cultivo de meristemos, que puede ser complementado con termoterapia y quimioterapia para obtener plantas libres de patógenos específicos. Se han desarrollado protocolos eficientes de regeneración de plantas a través de embriogénesis (Naing et al., 2016) o por organogénesis (Valle-Sandoval et al., 2008; Song et al., 2011; Mehedi et al., 2020; Babiker et al., 2021; Chonwdhury et al., 2021) utilizando diferentes tipos de explante y diversas formulaciones de medios de cultivo (*MC*) que

incluyen combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal.

Por lo que el presente trabajo tuvo el objetivo general de revisar el uso de la técnica de cultivo de tejidos aplicada a la propagación de crisantemo, específicamente para la obtención de *PM* de calidad sanitaria y fisiológica. Y como específicos: describir protocolos de micropropagación y revisar el diagnóstico y certificación de plantas libres de patógenos.

## Desarrollo

### Generalidades del cultivo de tejidos vegetales

El *CTV* permite la manipulación controlada de células, tejidos y órganos de las plantas, técnica que facilita el estudio del comportamiento celular y el análisis detallado de los procesos fisiológicos y genéticos que ocurren en condiciones *in vitro* (González-Rábade et al., 2011). Los avances en biología molecular y celular han impulsado el desarrollo de técnicas de manipulación genética, que profundizan en la comprensión de los mecanismos de crecimiento y desarrollo vegetal en plantas. En las últimas décadas, se han mejorado diversas estrategias con el objetivo de modificar positivamente características morfológicas y fisiológicas como productividad, tolerancia al estrés físico y químico, y resistencia a plagas y enfermedades (Delgado-Paredes et al., 2021).

En las condiciones controladas de cultivo de tejidos, es posible observar con precisión los eventos de división celular y formación de órganos, en respuesta a varios factores tales como composición de *MC*, temperatura, luz y humedad. La regeneración *in vitro* se ha logrado en múltiples variedades utilizando medios basales, diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (*RC*), aditivos como antioxidantes y otros.

La morfogénesis se desarrolla a partir de una gran variedad de explantes como tallos (nodal e internodal), yemas axilares, hojas, ápices o meristemos apicales, protoplastos, raíces, pedicelos y floretes (Valle-Sandoval et al., 2008). El éxito de este proceso depende en gran medida de la optimización del *MC*, en que se hayan definido la formulación de sales inorgánicas, los componentes

orgánicos como vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, los tipos y concentraciones de *RC*, apropiados para cada etapa del esquema de propagación; además de las condiciones de incubación que incluyen los rangos de temperatura, la iluminación en intensidad y fotoperiodo (Eisa et al., 2022).

### **Características y manejo de la planta madre en la propagación del crisantemo**

El *Chrysanthemum* es una planta perenne de la familia Asteraceae que puede alcanzar 1.50 m de altura. Sus hojas son lobuladas o dentadas, con superficie lisa o rugosa y de color verde oscuro o claro (Stace, 1991). Produce inflorescencias en capítulo con una gran diversidad de formas y colores (Vidale, 1983).

La propagación del crisantemo se realiza principalmente mediante esquejes herbáceos obtenidos de las *PM*. Este proceso consta de, 1) la *PM* desarrolla ramas laterales que se cortan como esquejes de consistencia herbácea. homogéneos en tamaño; 2) enraizado de esquejes, se preparan dejando las hojas en la mitad superior del tallo y que se establecen a densidades de 600 a 800 estacas m<sup>-2</sup>, en sustratos de densidad baja y alta porosidad; en ambientes de *HR* alta, producido por sistemas de nebulización intermitente en los horarios de mayor temperatura (Enríquez-del Valle et al., 2005). De acuerdo con otros autores esta práctica es elegida por su simplicidad y conservación en la descendencia (Zhang et al., 2013); 3) cultivo para producción de flor. El éxito del proceso depende del abastecimiento continuo de material vegetal inicial de excelente calidad fisiológica y sanitaria (Vences-Contreras et al., 2009).

Gaytan-Acuña et al. (2006) mencionan que los esquejes deben cumplir con estándares de calidad para garantizar un buen desarrollo y producción en invernadero. Durante la propagación, es necesario controlar la presencia de vectores de microorganismos patógenos, ya que los ambientes de enraizamiento favorecen la infección por patógenos de tipo hongos, bacterias y virus. Estas infecciones pueden reducir significativamente los

rendimientos y calidad de las cosechas de las flores (Wise et al., 2020; Eisa et al., 2022).

Una práctica común en el manejo de *PM* es el despunte o eliminación del ápice del tallo (aproximadamente 1 cm del extremo apical) que se realiza entre los 7 y 10 días posteriores al establecimiento en suelo. Esta práctica estimula el desarrollo de brotes a partir de yemas axilares. Una vez que un brote axilar alcanza unos 10 cm de altura, se corta su extremo superior (5-6 cm), el cual se utiliza como esqueje para su enraizamiento (Hartmann y Kester, 1980). Al cortar el esqueje, en la *PM* se procura quede un segmento del tallo con una o dos hojas; ya que en la base del pecíolo de cada hoja se localiza una yema vegetativa que dará origen a un nuevo brote axilar.

La *PM* puede producir entre 14 y 15 esquejes en un período de 10 a 15 semanas. Es fundamental que estos esquejes presenten óptima calidad sanitaria, fisiológica y ausencia de daños físicos. Si las *PM* presentan plagas, enfermedades o deficiencias nutrimentales y estos problemas no se corrigen oportunamente, la calidad de los esquejes se deteriorará progresivamente, afectando los lotes de plantas nuevas y, en consecuencia, una reducción en la calidad y el valor comercial de la cosecha de flores (Enríquez-del Valle et al., 2005; Solano-Báez et al., 2013). Se recomienda renovar la *PM* cada 5 a 6 meses, ya que después de este período la calidad de los esquejes que se obtienen de ésta disminuye notablemente. En México, gran parte del material vegetal para el establecimiento de cultivos agrícolas de crisantemo es importado, lo que incrementa los costos de producción (Olivera et al., 2000).

### **Metodología del cultivo *in vitro* en crisantemo**

La propagación clonal, aplicado a la producción de *PM* de crisantemo, tiene el objetivo de obtener plantas de mayor calidad fitosanitaria (Teixeira et al., 2003). Cuando el objetivo es producir plantas libres de patógenos, es posible iniciar los cultivos *in vitro* mediante el establecimiento de ápices meristemáticos (Mandal et al. 2000; Valle-Sandoval et al. 2008) ya que estos no poseen elementos vasculares desarrollados, dificultando el transporte de partículas virales de los órganos

maduros y enfermos, a los órganos jóvenes en crecimiento activo (Bhojwani y Dantu, 2013).

Para asegurar éxito en obtener plantas libres de patógenos específicos, mediante el uso de *CTV*, es posible aplicar algunos procedimientos complementarios: 1) someter a plantas en invernadero o cámaras de crecimiento a termoterapia, en el rango de 38 a 42 °C, durante periodos de 20-60 días, que ha mostrado ser altamente eficiente en la inactivación de la mayoría de virus de importancia económica (Wang et al., 2018); 2) iniciar los cultivos *in vitro* mediante el establecimiento de ápices meristemáticos, en que se tome en cuenta el tamaño del ápice meristemático lo que se ha demostrado mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus específicos (Mori y Hosokawa, 1977; Cha-um et al., 2006); 3) La quimioterapia se basa en el uso de sustancias antivirales como la ribavirina (Virazole®) y el oseltamivir, aplicadas en concentraciones de 10-50 mg L<sup>-1</sup>, ya sea incorporadas al medio de cultivo (*MC*) o mediante la inmersión de meristemas. La combinación de los procedimientos 1, 2 y 3 es una alternativa eficaz en la erradicación de virus en plátano (*Musa* spp.), papa (*Solanum tuberosum*), vid (*Vitis vinifera*), cítricos y numerosas especies ornamentales (Smith et al., 2017; Wang et al., 2018; Panattoni et al., 2021).

En los sistemas de producción de plantas de crisantemo se ha incluido una etapa de *CTV* para producir *PM* que se obtienen de micropropagación, se transfieren a sustrato e invernadero para su aclimatación, y se tienen varias categorías: 1) bloque básico (primera generación de *PM*, que son plantas micropropagadas a partir de ápices meristemáticos, las que se transfieren de *in vitro* a sustrato para su aclimatación; posteriormente se trasladan a suelo bajo condiciones controladas (generalmente en invernadero protegido) y reciben cuidados rigurosos para garantizar que se mantengan

protegidas de vectores, para mantenerlas en óptimo estado sanitario y fisiológico. 2) Bloque de incremento, segunda generación de *PM*, que se originan del enraizado de esquejes obtenidos de las plantas del bloque básico. La cantidad de plantas de este bloque de incremento es mayor, y se debe cultivar bajo cuidados que conserven su sanidad y calidad fisiológica. También se maneja con controles sanitarios estrictos, así como inspecciones visuales, pruebas de laboratorio, aislamiento; 3) producción final, que a partir del bloque de incremento se obtienen grandes cantidades de esquejes que se enraízan y se entregan a los agricultores como plantas certificadas o de calidad certificada, que se cultivan para producción de flor. Este esquema es el estándar en programas de certificación de material vegetal sano, y permite producir miles de plantas idénticas, libres de virus y de alta calidad (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023).

Las técnicas de *CTV* requieren en términos generales se cumplan varios requisitos: 1) condiciones de asepsia; 2) uso de *MC* de composición definida; 3) condiciones físicas de incubación. Los que se describen a continuación.

Condiciones de asepsia. Se describen los métodos de esterilización superficial de explantos (material vegetal con que se inicia el cultivo *in vitro*), materiales de laboratorio, *MC*. El éxito del cultivo *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* depende en gran medida de la esterilización efectiva de explantos y del material de laboratorio.

Como requisito para el establecimiento *in vitro* de crisantemo, se espera excluir patógenos y obtener cultivos asépticos (Tabla 1); por lo anterior, se describen los procedimientos para desinfección superficial de los tejidos y órganos vegetales de crisantemo (Tabla 2) y procedimientos aplicados en tejidos (Tabla 3).

**Tabla 1.** Tipo de explante del material vegetal y procedimiento de esterilización superficial en preparación a su establecimiento *in vitro* en tejidos- órganos de crisantemo.

Explante	Modificación clave	Tasa de éxito	Referencia
Hojas	Inmersión en NaOCl 1.0 % durante 5 min + 0.1 % HgCl <sub>2</sub> durante 3 min. Seguido de enjuagues con agua esterilizada.	92 % sin contaminación	Manokari et al. (2023)
Pétalos	Inmersión en NaOCl 1.0 % durante 5–7 min + antioxidante (100 mg L <sup>-1</sup> ácido ascórbico). Seguido de enjuagues con agua esterilizada.	90 % regeneración	Li et al. (2024)
Yemas axilares	Inmersión en NaOCl 2.0 % durante 10 min + etanol al 70 % durante 30 segundos. Seguido de enjuagues con agua esterilizada.	96 % supervivencia	Waseem et al. (2022)
Tallos con callo previo	Inmersión en NaOCl 2.5 % durante 15 min + AgNO <sub>3</sub> 5 mg L <sup>-1</sup> en medio (post-esterilización). Seguido de enjuagues con agua esterilizada.	< 1 % contaminación	Kim et al. (2023)

Nota: El HgCl<sub>2</sub> (cloruro mercuríco) es altamente efectivo pero tóxico.

**Tabla 2.** Pasos de un procedimiento para realizar la desinfección superficial del material vegetal de crisantemo

Paso	Procedimiento	Tiempo (min)	Observaciones
1	Selección y prelavado	30–60	Tomar explantes jóvenes (4–6 semanas) de <i>PM</i> sanas. Lavar con agua corriente + 2–3 gotas de detergente líquido (Tween 20 o jabón neutro).
2	Desinfección inicial	1–2	Sumergir en etanol 70 % con agitación suave.
3	Enjuague estéril	3 × 1	Agua destilada estéril.
4	Esterilización principal	8–12	Hipoclorito de sodio (NaOCl) 1.5–2.0 % + 2 gotas Tween 20/100 mL. Agitación constante.
5	Enjuague final	4 × 1	Agua destilada estéril.
6	Secado	1–2	Sobre papel estéril en cabina de flujo laminar.

(Adaptado de Naing et al., 2021; Manokari et al., 2023; Li et al., 2024). *PM* = plantas madre.

Los cultivos de la etapa de establecimiento de cultivos asépticos se colocan en incubación y en el transcurso de hasta seis semanas se eliminan aquellos que se contaminan por hongos o bacterias, y otros cultivos que hayan muerto debido a daños por el procedimiento de desinfección en la etapa de establecimiento de cultivos *in vitro*. Los cultivos que se hayan logrado asépticos y viables, se observan respuestas de división celular y desarrollo de órganos (tallos con

yemas axilares, formación de raíces adventicias). De los órganos que hayan desarrollado, se continúa con inducir su proliferación por lo que el material vegetal se extrae de su cultivo *in vitro* y en condiciones asépticas de la campana de aire filtrado de flujo laminar horizontal, el uso de materiales y herramientas esterilizados, son cortados y transferidos- subcultivados a otros recipientes *in vitro*, en donde continúe la proliferación de propágulos (Tabla 4).

**Tabla 3.** Tratamientos de desinfección superficial aplicados a tejidos de crisantemos y niveles de éxito obtenidos para lograr cultivos asépticos.

Estrategia	Aplicación	Eficacia	Referencia
Antibióticos en medio	Cefotaxima 200-500 mg L <sup>-1</sup>	Reduce 70–90 %	Naing et al. (2021)
Nanopartículas de plata (AgNPs)	4-7.5 mg L <sup>-1</sup> en medio Murashige & Skoog, 1962 (MS)	98 % control, sin fitotoxicidad	Manokari et al. (2023)
Dióxido de cloro	0.01 mg L <sup>-1</sup> ClO <sub>2</sub>	La supervivencia del trasplante alcanzó el 100 %	Tian et al. (2022)
Cultivo en oscuridad inicial	7 días a 25 °C	Reduce estrés oxidativo y contaminación	Li et al. (2024)

**Tabla 4.** Esterilización de material de laboratorio.

Material	Método de esterilización	Condiciones	Frecuencia
Frascos, tapaderas, tubos	Autoclave	121 °C, 1.05 kg cm <sup>-2</sup> , 15–20 min	Cada uso
Pinzas, bisturí, tijeras	Autoclave o esterilización en calor seco	121 °C (15 min)	Cada uso
Superficies de trabajo	Lámpara UV + etanol 70 %	UV 30 min + limpieza con etanol	Antes y después
Agua destilada / medios	Autoclave	121 °C, 15 min	Siempre
Pipetas, puntas	Desechables estériles o autoclave en bolsa	121 °C, 1.05 kg cm <sup>-2</sup> , 15–20 min	Cada lote

Uso de *MC* de composición definida que mediante experimentación al comparar diferentes mezclas se determinó una como la más adecuada para el crecimiento óptimo de células o tejidos en condiciones controladas *in vitro*. Existen numerosas formulaciones de sales inorgánicas para *CTV*, y la formulación de sales inorgánicas *MS* es de las más usadas para numerosas especies vegetales. Las sales minerales se complementan con vitaminas, *RC* vegetal, fuente de carbono (sacarosa). El pH se ajusta entre 5.7 a 5.8 antes de agregar el agente gelificante, que se disuelve y distribuye a los recipientes. Posteriormente se somete a esterilización por autoclave (121 °C, 15-20 min). Las formulaciones varían según el cultivar, el tipo de explante, el tipo de respuesta que se espera, ya sea proliferación de brotes,

organogénesis, o enraizamiento (Rodríguez et al., 2014).

Para la regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemas apicales, éstos se establecieron en *MC* con las sales inorgánicas *MS*, 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, en que se usaron combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) en cuatro concentraciones (0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 mg L<sup>-1</sup>) y de Kinetina (K) (0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>). El pH ajustado a 5.8 antes de agregar 6.5 g L<sup>-1</sup> de agar (Vences-Contreras et al., 2009). Mientras que para la regeneración *in vitro* de *D. grandiflora* var. Micromargara, se usó *MC* con las sales minerales *MS* suplementado con 4.4 µM de BAP, 2.2 g L<sup>-1</sup> de gelrite, y 0, 15 o 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Cruz et

al., 2016). También se ha evaluado el desarrollo *in vitro* de propágulos de crisantemo a partir de segmentos de tallo establecidos en *MC* con sales inorgánicas MS, suplementado con ácido  $\alpha$ -naftalenacético y bencilaminopurina (0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>), los que conservaron fidelidad clonal tras micropropagación, durante subcultivos repetidos (Jevremovic y Radojevic, 2004). Para obtener la regeneración directa *in vitro* de, *D. × grandiflorum* cv. Kitam, segmentos de tallo se establecieron en *MC* con las sales inorgánicas MS, con 3 % de sacarosa, 2.0 ó 3.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, y 0.1 a 1.8 mg L<sup>-1</sup> de AIA, y 0.6 % de agar. Posteriormente, para inducir que los brotes formasen raíces adventicias, estos se colocaron en el medio MS basal al 50 % de sus sales, 1.5 % de sacarosa y 0.6 % de agar (Valle-Sandoval et al., 2008). Pant et al. (2015) reportaron un método sencillo y económico para la propagación *in vitro*, masiva de *Chrysanthemum morifolium*, al usar *MC* con sales inorgánicas MS suplementado con una baja concentración de BAP. En el *MC* se usó cáscara de psilio y azúcar comercial como alternativas que sustituyeron al agar y la sacarosa purificada.

Condiciones físicas de incubación. En complemento a la composición del *MC* y para lograr una respuesta determinada, es necesario el control de las condiciones físicas de incubación: rango de temperatura, iluminación (intensidad, fotoperiodo, calidad), gases componentes de la atmosfera *in vitro*.

### Etapas de un esquema de propagación *in vitro*

Un esquema de propagación clonal *in vitro* de crisantemo incluye las etapas siguientes:

Etapas 0, de selección de material vegetal y su preparación para el cultivo *in vitro*. Consiste en seleccionar una planta sobresaliente y sana, la que se establece en invernadero o vivero, donde se somete durante varias semanas a condiciones ambientales: iluminación, abastecimiento de agua y nutrimentos en cantidades apropiadas, control de plagas y enfermedades, para mejorar su condición de sanidad y fisiológica, y ya cumplido este requisito, esta planta será el orteto, donadora de los tejidos, órganos, que se usarán en el sistema de propagación (Wang et al., 2020).

Etapas I, de establecimiento de cultivos asépticos. En esta etapa los tejidos vegetales obtenidos de la planta orteto, se someten a desinfección superficial y se establecen *in vitro*. En el caso de crisantemo, variedad 'White Reagan' se usaron tejidos de hoja y segmentos nodales, que su desinfección superficial consistió de la secuencia siguiente: lavado con agua y detergente, seguido de inmersión en etanol al 70 % por 30 segundos y posterior inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos; enjuagues con agua esterilizada. Los tejidos vegetales se establecieron en *MC* que contenía sales y vitaminas MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 7 g L<sup>-1</sup> de agar. Los cultivos *in vitro* se incubaron durante 21 días en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 h oscuridad y temperatura de 25 ± 2 °C. En tales condiciones se logró que 85 % de los explantos se lograsen asépticos y en 70 % de éstos ocurrió la formación de callos (González et al., 2020). Además de lograr cultivos asépticos *in vitro*, se espera que en los tejidos vegetales ocurran división celular y formación de órganos (brotes axilares, brotes adventicios, raíces, embriones somáticos).

Etapas II, de proliferación de propágulos. Tiene como objetivo la producción masiva de brotes axilares o adventicios a partir de las células, órganos que se formaron durante la Etapa I. Entonces, en condiciones asépticas los órganos se cortan en segmentos para establecerlos en medio de cultivo para inducir alguna respuesta de morfogénesis, como la activación de meristemas, la organogénesis (Teixeira et al., 2021) que, en el caso de crisantemo, se obtuvieron nuevos brotes a partir de segmentos de tallo con yemas axilares (Yesmin et al., 2014). En esta fase, los explantos que, en la etapa I lograron establecerse asépticamente, se transfirieron a un *MC* para promover la brotación de múltiples yemas axilares, compuesto por sales minerales y vitaminas MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 g L<sup>-1</sup> de agar, 1.5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (bencilaminopurina) y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético) (Lim et al., 2019). En crisantemo cv. Euro, los cultivos se incubaron bajo fotoperiodo de 16 h luz, temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa del 60–70 % durante cuatro semanas. En estas condiciones, se

observó el desarrollo de 4.2 brotes por explanto (INIFAP, 2023). Vences-Contreras et al. (2009) cultivaron *in vitro* diversas variedades de crisantemo (*D. grandiflora* Tzvelev.) Eleonora amarilla y blanca, Indianápolis blanco, margarita ocre, coral y roja, puma amarillo y blanco, spider blanco y vikingo amarillo, que son las más cultivadas comercialmente en la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Para la etapa I se usaron ápices meristemáticos, que se establecieron en MC que contenían las sales inorgánicas de MS, 0,4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y diversas combinaciones de BAP y ANA, el pH fue ajustado a 5.7– 5.8 antes de agregar 6.5 g L<sup>-1</sup> de agar (Enríquez-del Valle et al., 2005). Los cultivos se incubaron durante 30 días en condiciones de temperatura promedio de 25 ± 2 °C, y fotoperiodo de 16 h luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y ocho horas de oscuridad. En el periodo citado se observaron diferencias en el factor de multiplicación desde I:8 hasta I:29, con las variedades más productivas: Puma amarillo y Vikingo amarillo. Diversos estudios han demostrado que no existe una combinación óptima estándar de RC aplicable para todas las variedades, debido a la fuerte influencia del factor genotípico (Teixeira, 2003).

Etapa III, enraizado de brotes y preparación para trasplante a suelo. Los tallos-brotes en cultivo *in vitro*, se establecen en un MC que favorece el desarrollo de raíces adventicias o embriones somáticos para formar plántulas completas, como paso previo a que las plantas se transfieran a macetas con sustrato. Brotes de crisantemo cv. Euro fueron transferidos a un MC compuesto por las sales inorgánicas MS a mitad de concentración, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido indolbutírico) y 7 g L<sup>-1</sup> de agar. Los cultivos *in vitro* se incubaron durante 21 días en condiciones similares a las etapas anteriores, y 90 % de los brotes formaron raíces adventicias (INIFAP, 2023).

Etapa IV, de aclimatación de plantas micropropagadas. Grattapaglia y Machado (1998) indican que la aclimatación es importante debido

a que las plantas obtenidas *in vitro* presentan escasa o nula formación de ceras epicuticulares, estomas ineficientes en su apertura y cierre, raíces poco eficientes para absorción de agua, y actividad fotosintética reducida, por lo que son susceptibles a estrés de trasplante y no controlan la pérdida de agua en caso de establecerlas en un ambiente de vivero o campo. Por lo que las vitroplantas deben ser establecidas en un ambiente que permita su adaptación gradual, en que se promuevan cambios morfológicos y fisiológicos hasta que las plantas presenten características apropiadas para su establecimiento en vivero (Ritchie et al., 1991). Enríquez-del Valle et al. (2005) propagaron *in vitro* plantas de *Dendranthema grandiflora* cv. Polaris White, las plántulas se extrajeron del MC, se lavaron cuidadosamente para eliminar residuos de agar y trasplantaron a un sustrato compuesto por 100 % tierra de monte, sin aplicación de fertilizante mineral. Las plantas se mantuvieron en condiciones de radiación solar reducida al 50 %, con alta humedad relativa e iluminación incandescente de 100 W m<sup>-2</sup> por 4 h nocturnas. Durante las cinco semanas siguientes se realizó una reducción gradual de la humedad hasta alcanzar condiciones similares al ambiente *ex vitro*. La tasa de supervivencia durante la aclimatación fue del 95 %.

Durante la adaptación ocurren cambios fisiológicos y morfológicos en las plantas. En condiciones *in vitro* los propágulos vegetales están expuestos a intensidades de iluminación reducidas, 20 a 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, y en estas condiciones desarrollan tallos delgados y de entrenudos largos. Las hojas de las plantas son pequeñas, de poco grosor y tienen mayor concentración de clorofila. A nivel fisiológico, las plantas reducen su punto de compensación de luz para equilibrar la actividad fotosintética reducida (Ferrante y Mariani, 2018). En condiciones de intemperie las plantas estarán expuestas a irradiancias de 1000 a 1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por lo que al extraerlas del cultivo *in vitro* se les debe exponer gradualmente a irradiancias cada vez mayores.

El CTV se ha aplicado en crisantemo desde hace 40 años, y aun se publican reportes de investigaciones relacionadas con la biología del

desarrollo en esta especie. Plantas de crisantemo var. Zembra que en condiciones de invernadero estuvieron expuestas a intensidades de iluminación de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , su actividad fotosintética fue de  $4.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Casierra-Posada et al., 2013). Se evaluó la nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro*, que durante su aclimatación en invernadero se irrigaron con diversas diluciones de solución nutritiva. Las plantas mostraron diferencias de crecimiento en relación positiva a la cantidad de nutrimentos que se les suministró en el riego (Enríquez-del Valle et al., 2005).

### Diagnóstico y certificación de plantas libres de patógenos

El diagnóstico y la certificación de plantas libres de patógenos son procesos para garantizar la sanidad vegetal, prevenir la diseminación de enfermedades y cumplir con las regulaciones fitosanitarias nacionales e internacionales. Implica implementar procedimientos indicados en Normas, complementado con actividades reguladas por organismos oficiales que incluyen la inspección visual y métodos de laboratorio avanzados.

Los documentos de NOM-EM-021-FITO-1994, Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas (LFPCCS), Regla para la Calificación de Semilla de Crisantemo y Reglamento de la LFPCCS, forman un marco normativo interconectado en México para garantizar la sanidad vegetal en el cultivo de crisantemos, con énfasis en el diagnóstico (detección y vigilancia de patógenos como hongos, virus y plagas) y la certificación (verificación oficial de ausencia de patógenos para material de propagación). Este enfoque es crítico para la exportación, ya que el crisantemo es una flor de corte de alto valor, vulnerable a enfermedades cuarentenarias (SENASICA, 2023).

La producción de material de propagación de crisantemo en México debe cumplir obligatoriamente con la NOM-EM-021-FITO-1995, que establece el uso de casas-malla antiáfidos y monitoreo semanal (DOF, 25-10-1994). Además, la LFPCCS obliga a que todo

esqueje comercializado o exportado cuente con certificación oficial de categoría “Certificada” (DOF, 15-06-2007; Última Reforma DOF, 11-05-2018). El procedimiento operativo específico para la calificación de lotes se encuentra detallado en la regla para la calificación de semilla de crisantemo (SNICS, 2014), mientras que los requisitos de muestreo y diagnóstico más actualizados están en los lineamientos técnicos vigentes del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2023).

### Normas de calidad y certificación fitosanitaria

La certificación es un proceso formal que se basa en los resultados del diagnóstico y el cumplimiento de estándares específicos. Estándares y Normativas: La producción de material vegetal certificado debe cumplir con Normas Oficiales Mexicanas y estándares internacionales, que establecen los requisitos fitosanitarios para la producción, movilización e importación/exportación de plantas.

En México, el SENASICA es el organismo oficial encargado de regular y emitir certificados fitosanitarios. También existen organismos de certificación privados acreditados que realizan auditorías para garantizar la conformidad con las normas. Es de observancia general en toda la República Mexicana. Su aplicación corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, hoy SADER) a través del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). No se registran reformas mayores posteriores a 2011 hasta noviembre de 2025 (DOF, 15-06-2007; Última Reforma DOF, 11-05-2018).

La LFPCCS tiene por objetivo regular la producción de semillas certificadas, su calificación y comercialización, con el fin de fomentar la planeación agrícola, elevar el rendimiento y calidad de las cosechas, y promover el uso de semillas de alta calidad. Se alinea con el artículo 27 constitucional y la Ley de Desarrollo Rural Sustentable. Prioriza el acceso a semillas para pequeños productores, la investigación y la coordinación intersectorial, sujetándose a

**Tabla 5.** Factores de calidad y niveles mínimos

Factor	Descripción	Niveles mínimos (Básica, Registrada, Certificada)	Habilitada
<b>Genética</b>	Pureza varietal por Guía Técnica UPOV-armonizada; verificación en floración. <sup>o</sup>	Ausencia de off-types (> límites por inspección); identidad al 100 %.	No cumple total, pero inspeccionada.
<b>Física</b>	Longitud esquejes (6-8 cm), raíces (2-5 cm, blancas); vigor visual bueno.	≥ 90 % enraizadas; madurez fisiológica, sin deficiencias.	< 90 % enraizadas, pero viables.
<b>Fisiológica</b>	PM vegetativas (iluminación nocturna); vida útil ≤ 9 meses (máx. 40 esquejes/planta).	Máx. 3 generaciones <i>in vitro</i> (6 meses c/u); sin yemas prematuras ni callo.	Cumple parcial; para incremento propio.
<b>Fitosanitaria</b>	Libre de plagas (insectos, nematodos), enfermedades (roya, botritis), virus y hongos.	Ausencia total de roya/virus; fungicida de amplio espectro aplicado.	Inspeccionada, pero posible presencia mínima.

presupuestos federales (DOF, 15-06-2007; Última Reforma DOF, 11-05-2018). Para efectos de esta Ley, se define como semilla la obtenida del fruto después de la fecundación de la flor, de los frutos o partes de éstos, así como partes de vegetales o vegetales enteros utilizados para la reproducción y propagación de las diferentes especies vegetales.

Regla para la calificación de semilla de crisantemo (*Chrysanthemum × hortorum*) RLFPCCS, emitida por el SNICS, con el objetivo de establecer criterios, procedimientos y especificaciones para calificar semillas y material de propagación (esquejes y plantas) (Tabla 5), asegurando calidad genética, física, fisiológica y fitosanitaria. Facilita la producción, distribución y comercio, con énfasis en propagación vegetativa. (SNICS, 2014).

En el ámbito de aplicación y comercializadores de esquejes, plantas micropropagadas y material para producción comercial, cubre categorías de calificación para variedades registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. El cual excluye semillas botánicas; enfocado en esquejes (6-8 cm) y cultivo *in vitro* y para importaciones: Requiere etiqueta de certificación del país origen y Certificado Fitosanitario, cumpliendo Normas Oficiales Fitosanitarias Mexicanas (DOF, 02-09-2011)

### Comentarios finales

El crisantemo es de las flores de corte más importantes a nivel mundial y nacional, destacando México como uno de los principales productores. Sin embargo, la propagación convencional mediante plantas madre de las que se cortan ramas de consistencia herbácea para su uso como estacas (esquejes) que se induce su enraizado, presenta limitaciones significativas: acumulación progresiva de patógenos (hongos, bacterias y especialmente virus), pérdida de vigor fisiológico, baja *TM* y dependencia estacional, lo que incrementa los costos de producción y reduce la calidad comercial de la flor.

El cultivo de tejidos vegetales, aplicado a la micropropagación clonal de crisantemo, inicia con el cultivo de ápices meristemáticos y el posterior incremento de propágulos a través de brotes axilares y organogénesis, es una solución biotecnológica eficiente para la producción masiva de plantas madre elites libres de patógenos y genéticamente uniformes. Se tienen protocolos de micropropagación de crisantemo en que se describen los tejidos a usar, las condiciones de medio de cultivo e incubación; posteriormente las condiciones para la aclimatación en invernadero de las plantas micropropagadas y el posterior establecimiento de las plantas en suelo e

invernadero para cultivarlas como plantas madre-orteto. La integración de estas técnicas en los programas de producción comercial garantiza la producción de material vegetal sano y fiel al tipo, que además reduciría la dependencia de importaciones, y mejora la competitividad de los floricultores mexicanos, contribuyendo a la sostenibilidad del sector al minimizar el uso de agroquímicos para el control de enfermedades. Futuras investigaciones deberán enfocarse en optimizar protocolos específicos por cultivar, evaluar el comportamiento en campo de las plantas micropropagadas, e incorporar herramientas complementarias como termoterapia y quimioterapia para la eliminación total de viroides y virus de difícil eliminación.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), que otorgó a la primera autora una Beca Nacional para estudios de posgrado en México.

### Referencias

Azadi, P., Bagheri, H., Nalouisi, A. M., Nazari, F. & Chandler, S. F. (2016). Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1073-1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.006>

Babiker, Y. F., Elorky, M. G., Elmokadem, H. E., El-Naggar, H. M. and Meheissen, M. A. M. (2021). Establishment of callus cultures of *chrysanthemum* (*Dendranthema × grandiflorum*) var. 'Zembla yellow'. *Alexandria Journal of Agricultural Sciences*, 66(5), 123-132.

Bello-Bello, J. J. & Spinoso-Castillo, J. L. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), e00063.

<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>

Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. (2013). Production of virus-free plants. Springer. *In Plant tissue culture: An introductory text*. pp. 227-243. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_16).

Casierra-Posada, F., Peña-Olarte, J. E. & Cardona-Ayala, C. E. (2013). Respuesta fotosintética de plantas de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) cv. Zembla a diferentes intensidades lumínicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 47-56. <https://doi.org/10.17584/rcch.2013v7i1.1975>

Castello, I., D'Emilio, A., Baglieri, A., Polizzi, G. & Vitale, A. (2022). Management of Verticillium wilt of *chrysanthemum* through VIF soil mulching combined with reduced-dose fumigation. *Agriculture*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/agriculture12020141>

Cha-um, S., Hien, N. T. & Kirdmanee, C. (2006). Disease-free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using *in vitro* meristem culture. *Biotechnology*, 5(4), 443-448.

Chonwdhury, J., Hoque, M. I. y Sarker, R. H. (2021). Development of an efficient *in vitro* regeneration protocol for *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Plant Tissue Culture and Biotechnolgy*, 31, 161-171. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v31i2.57344>

Cruz, Y. N., Chi-Sánchez, F., Uc-Várguez, A., Ramos-Díaz, A. & Cano-Sosa, J. (2016). Regeneración *in vitro* y transformación genética del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. micromargara). *Mexican Journal of Biotechnology*, 1(1), 51-59.

Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., Esquerre-Ibañez, B., Bazán-Sernaqué, P. & Rojas-Idrogo, C. (2021). Cultivo de tejidos *in vitro* en propagación de plantas y conservación de germoplasma de especies económicamente importantes en el Perú. *Scientia Agropecuaria*, 12(3), 337-349.

- <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.037>
- DOF (Diario Oficial de la Federación) (1994, octubre 25). NORMA Oficial Mexicana (con carácter de emergencia) NOM-EM-021-FITO-1994, por la que se establece con carácter obligatorio la campaña de prevención y acción contra la plaga denominada roya blanca del crisantemo. 25-10-1994. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/mex13097.pdf>
- DOF (Diario Oficial de la Federación). (2007, junio 15; Última Reforma, 2018, noviembre 05). Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas [LFPCCS], 15-06-2007. [https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFPCCS\\_110518.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFPCCS_110518.pdf)
- DOF (Diario Oficial de la Federación) (2011, septiembre 2). Reglamento de la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas. Nuevo Reglamento 02-09-2011. [https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg\\_LFPCCS.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LFPCCS.pdf)
- Eisa, E. A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A. Y., & Gururani, M. A. (2022). *Chrysanthemum*: A comprehensive review on recent developments in *in vitro* regeneration. *Biology*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biology11121774>
- Enriquez-del Valle, J. R., Velásquez, B., Vallejo, A. R., & Velasco, V. A. (2005). Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4), 337–383.
- Ferrante, A. & Mariani, L. (2018). Agronomic management for enhancing plant tolerance to abiotic stresses: High and low values of temperature, light intensity, and relative humidity. *Horticulturae*, 4(3), 21. <https://doi.org/10.3390/horticulturae403021>
- García-Velasco, R., Zavaleta, E., Rojas, R. I., Leyva, S. G., Simpson, J. K., & Fuentes, D. G. (2005). Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 79–86.
- Gaytan-Acuña, E. A., Ochoa-Martínez, D. L., García-Velasco, R., Zavaleta-Mejía, E. & Mora-Aguilera, G. (2006). Producción y calidad comercial de flor de crisantemo. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 541–548.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S. & Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* — A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
- González, A., Pérez, M., & Ramírez, L. (2020). Establecimiento *in vitro* de tejidos de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) para micropropagación. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 20(3), 45–52.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. (1998). Micropropagação. En A. C. Torres, L. S. Caldas, & J. A. Buso (Eds.), *Cultura de tejidos y transformación genética de plantas* (1). 509–564. EMBRAPA.
- Hartmann, H. T. & Kester, D. E. (1980). *Propagación de plantas: Principios y prácticas* (A. M. Ambrosio, Trad.). Continental.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) (2023). Protocolo de micropropagación de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) cv. Euro' para producción de plantas libres de virus (Protocolos de Biotecnología Vegetal No. 15). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. [https://www.inifap.gob.mx/publicaciones/Documentos/Protocolo\\_micropropagacion\\_crisantemo\\_cv\\_Euro\\_2023.pdf](https://www.inifap.gob.mx/publicaciones/Documentos/Protocolo_micropropagacion_crisantemo_cv_Euro_2023.pdf)
- Jevremovic S. y Radojevic, L.J. (2004). Producción masiva de diferentes cultivares de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) mediante cultivo *in vitro*. *Journal of Agriculture Sciences Research*, 65, 47–54.
- Kim, H. J., Lee, S. Y., Park, J. W., & Kim, M. S. (2023). Post-sterilization supplementation of AgNO<sub>3</sub> in medium enhances endogenous contamination control in stem explants with

- pre-induced callus for woody plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 152(1), 89–102. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02415-8>
- Kondo, T., Yamashita, K., & Sugiyama, S. (2011). First report of Impatiens necrotic spot virus infecting chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 77(4), 263–265. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0317-y>
- Leyva-Mir, S. G., Lora-Trejo, I., Cárdenas-Soriano, E. & Valdovinos-Ponce, G. (2001). Patogénesis de la roya blanca *Puccinia horiana* Henn. en una variedad susceptible de crisantemo [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hemsl.]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 191–196.
- Li, J., Wang, Y., Zhang, H. & Chen, X. (2024). Initial dark incubation mitigates oxidative stress and microbial contamination in plant tissue culture: Insights from physiological and molecular analyses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 158(3), 45. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02678-9>
- Lim, J. H., Kim, Y. J. & Park, Y. G. (2019). Effect of cytokinins and auxins on shoot multiplication of *chrysanthemum* cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(4), 523–531. <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00145-7>
- Linares, H. (2005). *El cultivo del crisantemo*. Programa de Jóvenes Emprendedores Rurales.
- Mandal, A. K. A., Chakrabarty, D., & Datta, S. K. (2000). Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of *chrysanthemum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(1), 33–38. <https://doi.org/10.1023/A:1006459930178>
- Manokari, M., Cokul Raj, M., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A. A., Joshee, N., & Shekhawat, M. S. (2023). Silver nanoparticles improved morphogenesis, biochemical profile and micro-morphology of *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154(1), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02502-w>
- Mehedi, M. N.H., Mitu, N., Robbani, M., Sukhi, K. F. N., Rahman, M.H. S. y Noor, M. A. (2020). Impact of different explants and growth regulators on *in vitro* regeneration of *Chrysanthemum*. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 4(4), 10–8. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2020/v4i430112>
- Mori, K. & Hosokawa, D. (1977). Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. En *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes* (pp. 389–396).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naing, A.H., Park, Il. K., Chung, M.Y., Lim, K.B. and Kim, C.K. (2016). Optimización de los factores que afectan la regeneración eficiente de brotes en crisantemo cv. Shinma. *Brazilian Journal of Botany*, 39, 975–984. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0143-0>
- Naing, A. H., Sharmin, U., Soe, M. M. H., Lwin, K. H., & Khan, M. S. H. (2021). Antibiotics and Plant Preservative Mixture (PPM™) in contamination control of plant tissue culture: Efficacy and phytotoxicity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 145(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02045-7>
- Olivera, V. Z., Gutiérrez, M. A., Gutiérrez, J. A., & Andrade, M. (2000). Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*, 12(3), 75–80.
- Pant M., Lal, A. & Jain, R. (2015). Un método sencillo y económico para la propagación

- masiva de *Chrysanthemum morifolium* y evaluación de la actividad antibacteriana de plántulas cultivadas *in vitro*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5, 103–111. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50716>
- Panattoni, A., Ferrada, F., D'Anna, F. & Triolo, E. (2021). Combined thermotherapy and chemotherapy for virus elimination in woody fruit plants: A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 423–439. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02092-0>
- Quiroz, K. A., Berríos, M., Carrasco, B., Remales, J. B., Caligari, P. D. S. & García-González, R. (2017). Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biological Research*, 50. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0130-7>
- Ram, R., Verma, N., Kumar, K., Kulshrestha, S., Raikhy, G., Hallan, V., & Zaidi, A. A. (2009). Molecular studies on *Tomato aspermy* virus isolates infecting chrysanthemums. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(2), 99–111. <https://doi.org/10.1080/03235400600951779>
- Ritchie, G., Short, K. C., & Davey, M. R. (1991). *In vitro* acclimatization of *chrysanthemum* and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *Journal of Experimental Botany*, 42(245), 1557–1561.
- Rodríguez, M., Chacón, M., & Carrillo, R. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 119–122. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) (2023). (2025, agosto 8). \*Normas Oficiales Mexicanas en materia de sanidad vegetal. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/normas-oficiales-mexicanas-en-materia-de-sanidad-vegetal>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2023). (2025, 8 de mayo). *Ornamentos, la belleza también se expresa en datos*. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/891793/Brochure\\_Ornamentos\\_Feb\\_2024.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/891793/Brochure_Ornamentos_Feb_2024.pdf)
- Smith, I. M., Lozano, I., & Jones, R. A. C. (2017). Thermotherapy and chemotherapy for virus elimination in plants: Principles and applications. En M. A. Mayo & C. A. Ryan (Eds.), *Plant virology protocols* (3rd ed., pp. 215–238). Academic Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7315-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7315-0_12)
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). (2014). Regla para la calificación de semilla de crisantemo (*Chrysanthemum spp.*). Dirección General de Sanidad Vegetal. <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172408/Crisantemo.pdf>
- Solano-Báez, R. G., Barrales-Cureño, H. J., Cortés-Flores, J. I., & Enríquez-del Valle, J. R. (2013). Producción de esquejes en plantas madre de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19(3), 287–298. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.10.047>
- Song, J. Y., Mattson, N.S y Jeong, B. R. (2011). Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(7), 295–304.
- Stace, C. A. (1991). *Plant Taxonomy and Biosystematics* (2ª edición). Cambridge University Press, Cambridge. 279.
- Teixeira da Silva, J. A. (2003). *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances*, 21(8), 715–766.

- [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00117-4)
- Teixeira da Silva, J. A., Kher, M. M., Soner, D., & Nataraj, M. (2021). Advances in *chrysanthemum* tissue culture: A review. *Scientia Horticulturae*, 285, Article 110234. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110234>
- Tian, C., Xie, Z., Zhao, Y., Zhang, Z., Xue, T., Sheng, W., Zhao, F. y Duan, Y. (2022). Una concentración de dióxido de cloro de grado microgramo induce la regeneración vegetal en un solo paso en crisantemos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 58, 1138–1144. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10295-4>
- Valdez-Aguilar, L. A., Hernández-Pérez, A., Alvarado-Camarillo, D., & Cruz-Altunar, Á. (2015). Diseño de un programa de fertilización para crisantemo en base a extracción de macronutrientes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(12), 2263–2276.
- Valle-Sandoval, M. R., Mascorro-Gallardo, J. O., Gil-Vázquez, I., & Iturriaga-de la Fuente, G. (2008). Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema × grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia*, 24(3), 219–227.
- Vences-Contreras, C., Vázquez-García, L. M. & Hernández-Rodríguez, O. A. (2009). Regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemos apicales. *Agronomía Mesoamericana*, 20(2), 409–415.
- Vidale, H. (1983). *Producción de flores y plantas ornamentales*. Mundi-Prensa. 161 p.
- Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamäki, M. L., Hirata, Y. & Valkonen, J. P. T. (2018). Combined thermotherapy and antiviral compounds for elimination of viruses from vegetatively propagated plants. *Plant Disease*, 102(11), 2108–2120. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0489-FE>
- Wang, J., Su, Y., Kong, X., Ding, Z., & Zhang, X. S. (2020). Initiation and maintenance of plant stem cells in root and shoot apical meristems. *aBIOTECH*, 1(3), 194–204. <https://doi.org/10.1007/s42994-020-00020-3>
- Waseem, M., Khan, A. R., Fatima, S., & Ali, H. M. (2022). Efficient surface sterilization protocol for axillary bud explants in rose (*Rosa hybrida* L.) micropropagation: Impact on survival and contamination control. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(2), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02289-4>
- Wise, K., Gill, H., & Selby-Pham, J. (2020). Willow bark extract and the biostimulant complex Root Nectar® increase propagation efficiency in *chrysanthemum* and lavender cuttings. *Scientia Horticulturae*, 263, 109108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109108>
- Yesmin, S., Hashem, A., Das, K. C., Hasan, M. M., & Islam, M. (2014). Efficient *in vitro* regeneration of *chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture. *Nuclear Science and Applications*, 23(1-2), 47–50.
- Zalewska, M., Miler, N., & Wenda-Piesik, A. (2010). Effect of *in vitro* topophysis on the growth, development, and rooting of chrysanthemum explants (*Chrysanthemum grandiflorum* /Ramat./Kitam). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(4), 362–366. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512681>
- Zhou, J., Jiang, X., Agathokleous, E., Lu, X., Yang, Z., & Li, R. (2023). High temperature inhibits photosynthesis of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) seedlings more than relative humidity. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1272013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1272013>