



Efecto de la concentración de sacarosa y benciladenina en el desarrollo organogénico *in vitro* de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) †

[Effect of sucrose and benciladenine concentrations on *in vitro* organogenic development of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*)]

Jesús Ignacio Reyes-Díaz^{1*}, Cristopher Zanabria-Gutiérrez¹,
and Guadalupe Ramírez-Zea²

¹Unidad Académica de Capulhuac, Universidad Tecnológica del Valle de Toluca, Capulhuac de Mirafuentes, Estado de México, C.P. 52044, México.. *Email:

jesus.reyes@utvtol.edu.mx

²Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal (ICAMEX), Metepec, Estado de México, C.P. 52140, México.

*Corresponding author

SUMMARY

Background: *Chrysanthemum morifolium* is one of the most economically important ornamental species in Mexico, particularly in the State of Mexico. Optimizing *in vitro* propagation protocols is crucial to overcome the limitations of conventional methods and meet the demand for high-quality plants. **Objective:** To evaluate the effect of different concentrations of benzyladenine (BAP) and sucrose on the *in vitro* organogenesis of *C. morifolium* var. Indianapolis. **Methodology:** A completely randomized experimental design with a 3x3 factorial arrangement, plus a control, was established. Three concentrations of BAP (0.0, 0.5, and 1.0 mg L⁻¹) and three of sucrose (30, 45, and 60 g L⁻¹) were evaluated in an MS basal medium. The control consisted of a standardized medium with kinetin (1.0 mg L⁻¹) and sucrose (40 g L⁻¹). Variables of survival, callogenesis frequency, leaf number, main shoot length, and root length were recorded after 70 days of culture. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). **Results:** The combination of 0.5 mg L⁻¹ BAP and 30 g L⁻¹ sucrose (T4) significantly promoted survival (100%), shoot length (15.7 mm), and leaf number (6.2). The highest frequency of callogenesis (95.8%) was observed in the absence of BAP and with the maximum sucrose concentration (T3). Root development was limited across all treatments, observed in only 10% of explants, with no statistically significant differences among the treatments that induced roots. **Implications:** Optimizing the balance between hormonal and carbon source is fundamental to directing *in vitro* morphogenesis. The identified protocol (0.5 mg L⁻¹ BAP and 30 g L⁻¹ sucrose) allows for efficient direct organogenesis, which can lead to faster and more uniform clonal propagation, benefiting the productivity and competitiveness of ornamental growers. **Conclusion:** The concentration of 0.5 mg L⁻¹ BAP combined with 30 g L⁻¹ sucrose constitutes an optimal stimulus for direct organogenesis in *C. morifolium*, maximizing survival and shoot development, while high sucrose concentrations induce a stress response leading to callogenesis. **Key words:** *Chrysanthemum morifolium*; direct organogenesis; plant growth regulators; carbon source.

RESUMEN

Antecedentes: El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) es una de las especies ornamentales de mayor relevancia económica en México, particularmente en el Estado de México. La optimización de protocolos de propagación *in vitro* es crucial para superar las limitaciones de los métodos convencionales y satisfacer la demanda de plantas de alta calidad. **Objetivo:** Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de benciladenina (BAP) y sacarosa sobre la organogénesis *in vitro* de *C. morifolium* var. Indianápolis. **Metodología:** Se estableció un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 3x3, complementado con un testigo. Se evaluaron tres concentraciones de BAP (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) y tres de sacarosa (30, 45 y 60 g L⁻¹) en un medio base MS. El testigo consistió en un medio estandarizado con kinetina (1.0 mg L⁻¹) y sacarosa (40 g L⁻¹). Se registraron las variables de supervivencia, frecuencia de calogénesis, número de hojas, longitud del brote principal y longitud de la raíz después de 70 días de

† Submitted May 24, 2025 – Accepted March 17, 2026. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6351>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = J.I. Reyes-Díaz: <http://orcid.org/0000-0001-9234-6575>

cultivo. Los datos se analizaron mediante ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). **Resultados:** La combinación de 0.5 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa (T4) promovió significativamente la supervivencia (100%), la longitud del brote (15.7 mm) y el número de hojas (6.2). La mayor frecuencia de callogénesis (95.8%) se observó en ausencia de BAP y con la máxima concentración de sacarosa (T3). El desarrollo radicular fue limitado en todos los tratamientos, observándose en solo el 10% de los explantes, sin diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos que indujeron raíces. **Implicaciones:** La optimización del equilibrio hormonal y de la fuente de carbono es fundamental para dirigir la morfogénesis *in vitro*. El protocolo identificado (0.5 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ sacarosa) permite una organogénesis directa eficiente, lo que puede traducirse en una propagación clonal más rápida y uniforme, beneficiando la productividad y competitividad de los productores de ornamentales. **Conclusión:** La concentración de 0.5 mg L⁻¹ de BAP combinada con 30 g L⁻¹ de sacarosa constituye un estímulo óptimo para la organogénesis directa en *C. morifolium*, maximizando la supervivencia y el desarrollo del brote, mientras que altas concentraciones de sacarosa inducen una respuesta de estrés que deriva en callogénesis.

Palabras clave: *Chrysanthemum morifolium*; organogénesis directa; reguladores de crecimiento; fuente de carbono.

INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) se distingue como una de las principales plantas ornamentales a nivel mundial, con una alta demanda comercial derivada de su amplia variabilidad morfológica y de color, producto de extensos programas de mejoramiento genético (Teixeira Da Silva *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2016). En México, esta especie ocupa un lugar preponderante en la economía florícola. De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en México se cultivan anualmente alrededor de 2675 hectáreas de crisantemo, de las cuales el Estado de México concentra la mayor parte con 2460 hectáreas. Solo en 2020, esta entidad aportó \$1,587,000,000.00 MXN a la producción nacional, lo que representó el 87.8% del valor total del país, consolidándose como el principal productor de esta ornamental (SIAP, 2021).

La alta demanda comercial de crisantemo ha impulsado la adopción del cultivo *in vitro* como una biotecnología que permite superar las limitaciones (Cruz *et al.*, 2016). Esta técnica consiste en colocar un explante (porción de hoja, tallo, meristemo u otro tejido) en un medio nutritivo bajo condiciones controladas para inducir la formación de tejidos vegetativos, pudiendo regenerar plantas mediante dos vías principales: la organogénesis (formación de brotes) o la embriogénesis somática (formación de embriones) (George, Hall y Klerk, 2007). La optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* de *C. morifolium* resulta fundamental para reducir el intervalo temporal entre la fase de establecimiento en laboratorio y la etapa de adaptación a condiciones *ex vitro*, lo que requiere una comprensión profunda de los factores que regulan la morfogénesis durante el desarrollo.

La organogénesis constituye uno de los principales métodos de regeneración de plantas, pudiendo ser de dos tipos: directa o indirecta (Martín, Chong-Pérez y Pérez-Alonso, 2016). En la organogénesis directa, los órganos se desarrollan directamente a partir del explante sin atravesar una fase intermedia de callo,

siendo inducida por reguladores de crecimiento vegetal (RCV). En contraste, la organogénesis indirecta implica la formación de callo como un proceso morfogénico intermedio. Diversos factores influyen en este proceso, destacando la edad fisiológica del explante, el genotipo y la composición del medio de cultivo como elementos determinantes en la capacidad de formación de órganos (Salgado-Garciglia, 2014; Phillips y Garda, 2019).

Entre los reguladores de crecimiento más importantes en la organogénesis se encuentran las citocininas. Estas hormonas vegetales regulan aspectos fundamentales como la división celular, la diferenciación de tejidos, la senescencia y el desarrollo de cloroplastos (Hwang, Sheen y Müller, 2012; Miraval, 2017). Existen citocininas endógenas como la zeatina y la isopenteniladenina (IPA), así como citocininas de síntesis como la kinetina y la benziladenina (BAP) (Rojas-González, 2019). La BAP, en particular, promueve la división y elongación celular, induce el crecimiento de yemas axilares, regula el desarrollo de hojas, tallos y raíces, inhibe la senescencia foliar e incrementa la resistencia mediante la regulación de la actividad enzimática (Zhang *et al.*, 2023). En crisantemo, se ha documentado que concentraciones de BAP entre 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ favorecen la regeneración de brotes, aunque la respuesta óptima puede variar según la variedad y el tipo de explante utilizado (Zalewska, Lema-Rumińska y Miler, 2007; Naing *et al.*, 2014).

Paralelamente, la sacarosa desempeña un papel multifacético en el cultivo *in vitro*, actuando no solo como fuente de carbono y energía, sino también como molécula señalizadora que regula el desarrollo de plántulas, la rizogénesis, la floración y la expresión génica, modulando así diversos procesos fisiológicos (Koch, 2004; Rojas-González, 2019). Karim *et al.*, (2003) reportaron que, en el cultivo *in vitro* de crisantemo, concentraciones de 30 g L⁻¹ de sacarosa produjeron una alta proliferación de brotes, mientras que concentraciones de 50 g L⁻¹ resultaron en una menor producción, evidenciando la importancia de optimizar este componente. Concentraciones elevadas de sacarosa pueden generar estrés osmótico en los

explantos, afectando la absorción de nutrientes y la turgencia celular, lo que se traduce en una disminución del crecimiento y en la inducción de respuestas de desdiferenciación como la formación de callo (Hazarika, 2006; George, Hall y Klerk, 2007).

Estudios previos han demostrado que las concentraciones de BAP y sacarosa son determinantes para el desarrollo vegetal *in vitro*, influyendo en variables como la supervivencia de los explantes, la formación de callo, el número de hojas, la longitud del tallo y el desarrollo radicular (Naing *et al.*, 2014; Hussein *et al.*, 2017; Kharel *et al.*, 2022). Sin embargo, existe la necesidad de generar información específica para variedades comerciales ampliamente cultivadas en el Estado de México, como la variedad Indianápolis, para la cual no se dispone de protocolos optimizados de micropropagación. La mayoría de los estudios se han centrado en otras variedades o han utilizado segmentos foliares como explantes, lo que limita la extrapolación directa de los resultados a la propagación clonal mediante explantes axilares.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de diferentes concentraciones de benciladenina (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) y sacarosa (30, 45 y 60 g L⁻¹) sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *C. morifolium* variedad Indianápolis, analizando variables de supervivencia, formación de callo, número de hojas, longitud de tallo y longitud de raíz. A través de este enfoque, se busca identificar la combinación óptima que promueva la organogénesis directa y establecer las bases para un protocolo de propagación clonal eficiente que pueda ser transferido al sector productivo del Estado de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), ubicado en Metepec, Estado de México.

Material vegetal

Como fuente de explantes se utilizaron plantas madre de *C. morifolium* variedad Indianápolis color blanco, establecidas y conservadas en el banco de germoplasma *in vivo* del Laboratorio de Micropropagación de ICAMEX. De estas plantas se disectaron explantes axilares de aproximadamente 2 mm de longitud, los cuales fueron obtenidos a partir de segmentos nodales de plantas donadoras sanas y con vigor vegetativo uniforme. La selección de explantes axilares respondió a su mayor capacidad organogénica en comparación con otros tipos de explantes, así como

a su menor susceptibilidad a la oxidación fenólica durante las primeras etapas del cultivo.

Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon dos tipos de medios de cultivo: un medio testigo correspondiente a la formulación estandarizada para *Chrysanthemum* spp. en el laboratorio, y nueve medios experimentales derivados de la combinación factorial de tres concentraciones de sacarosa y tres concentraciones de benciladenina (BAP). Todos los medios tuvieron como base las sales minerales del medio MS 100% (Murashige y Skoog, 1962), complementadas con los siguientes componentes orgánicos: tiamina-HCl (0.4 mg L⁻¹), glicina (2.0 mg L⁻¹), ácido nicotínico (5.0 mg L⁻¹), mio-inositol (4.0 mg L⁻¹) y piridoxina-HCl (0.5 mg L⁻¹). Como agente solidificante se empleó agar en concentración de 6.0 g L⁻¹. El pH de todos los medios se ajustó a 5.7 utilizando soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N) previo a la adición del agar y a la esterilización.

El medio testigo (T10) se elaboró conforme a la formulación previamente estandarizada, adicionando sacarosa (40.0 g L⁻¹) y kinetina (1.0 mg L⁻¹). Para los tratamientos experimentales, se partió del mismo medio base, pero excluyendo la kinetina, y se incorporaron las combinaciones de sacarosa (30.0, 45.0 y 60.0 g L⁻¹) y BAP (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) según el tratamiento correspondiente. La dosificación de los reguladores de crecimiento se realizó a partir de soluciones stock preparadas con agua destilada estéril y filtradas previamente a su incorporación al medio.

Una vez preparados, se dispensaron volúmenes de 20 mL de cada medio en frascos de vidrio de pared plana con capacidad de 250 mL. Los frascos fueron tapados con tapones de polipropileno resistente a alta temperatura y esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 minutos. Posteriormente, los medios se almacenaron en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante siete días para verificar la ausencia de contaminantes microbianos previo al establecimiento de los cultivos.

Establecimiento de los cultivos *in vitro*

La siembra de los explantes se realizó en condiciones de estricta asepsia dentro de una campana de flujo laminar vertical previamente esterilizada con radiación ultravioleta durante 30 minutos y desinfectada con etanol al 98%. El material vegetal se sometió a un proceso de desinfección superficial que consistió en un lavado inicial con agua destilada estéril y Tween 20 al 0.1% durante 5 minutos, seguido de inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos y finalmente en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 minutos, realizando tres enjuagues con agua destilada

estéril después de cada paso. Todo el instrumental quirúrgico (pinzas de disección, bisturíes y tijeras) fue esterilizado por inmersión en etanol al 98% y flameado en mechero Bunsen antes de cada uso y entre la manipulación de diferentes tratamientos.

En cada frasco se inocularon ocho explantes axilares, los cuales fueron colocados sobre la superficie del medio de cultivo manteniendo una separación promedio de 10 mm entre ellos para evitar la competencia por nutrientes y permitir un adecuado desarrollo individual. La manipulación de los explantes se realizó con pinzas de punta fina, procurando minimizar el daño mecánico en los tejidos.

Condiciones de incubación

Los cultivos establecidos se incubaron durante un período de 70 días en una sala de crecimiento con condiciones ambientales controladas. La temperatura se mantuvo constante a 25 ± 2 °C, mientras que el fotoperíodo se estableció en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, proporcionado por lámparas fluorescentes de luz blanca fría que generaron una intensidad lumínica de 40 a 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nivel de los frascos de cultivo. Durante todo el período de incubación se realizaron observaciones periódicas cada siete días para monitorear el desarrollo de los explantes y detectar posibles contaminaciones.

Variables evaluadas

Transcurridos los 70 días de incubación, se procedió a la evaluación de las variables morfológicas en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar. Todas las mediciones se realizaron utilizando una regla metálica previamente esterilizada con etanol al 98% y flameada, con el fin de garantizar la precisión de las medidas y evitar contaminaciones cruzadas entre tratamientos.

La supervivencia de los explantes se determinó mediante el conteo de aquellos que permanecieron viables, con tejido verde y sin signos de necrosis o contaminación al final del período de cultivo, expresándose como porcentaje respecto al total de explantes sembrados por tratamiento.

La formación de callo se evaluó mediante inspección visual directa de la base de cada explante, considerando como respuesta positiva la presencia de cualquier masa celular no diferenciada perceptible a simple vista, con apariencia friable o compacta y coloración que varió entre crema y pardo claro. Los resultados se expresaron como porcentaje de explantes con formación de callo por tratamiento.

El número de hojas por explante se registró mediante conteo visual directo de todas las hojas completamente

expandidas y con desarrollo evidente, considerando únicamente aquellas con longitud superior a 2 mm y coloración verde característica.

La longitud del brote principal se determinó midiendo desde el punto de inserción del explante en el medio de cultivo hasta el ápice del brote de mayor desarrollo, colocando la regla metálica paralelamente al eje longitudinal del brote para garantizar la precisión de la medida.

Finalmente, la longitud de la raíz se midió cuando esta se encontraba presente, desde el punto de inserción en la base del explante hasta el extremo distal de la raíz más larga desarrollada.

Diseño experimental y análisis estadístico

El estudio se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de 3×3 , correspondiente a tres concentraciones de BAP (0.0, 0.5 y 1.0 mg L^{-1}) y tres concentraciones de sacarosa (30.0, 45.0 y 60.0 g L^{-1}), más un tratamiento testigo (T10) con la formulación estandarizada. En total se evaluaron 10 tratamientos, cada uno con tres repeticiones, considerando cada frasco como una repetición y cada explante como una unidad experimental, lo que resultó en 24 unidades experimentales por tratamiento (8 explantes por frasco \times 3 frascos).

Todos los datos obtenidos fueron registrados en hojas de cálculo y organizados en una matriz para su posterior análisis. Los datos correspondientes a variables cuantitativas (número de hojas, longitud de tallo y longitud de raíz) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. Cuando el ANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), se procedió a realizar una comparación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos se ejecutaron utilizando el paquete estadístico SAS (*Statistical Analysis System*) versión 9.4. Los datos correspondientes a porcentajes de supervivencia y callosidad se presentan de manera descriptiva, dado que su naturaleza proporcional y la ausencia de replicación independiente para estas variables a nivel de frasco limitaron la aplicación de pruebas paramétricas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo general de los explantes de *Chrysanthemum morifolium*

Durante los 70 días de cultivo *in vitro*, se observó una marcada respuesta diferencial de los explantes de *C.*

morifolium variedad Indianápolis en función de las concentraciones de BAP y sacarosas evaluadas. Las variaciones en el crecimiento y desarrollo fueron evidentes desde los primeros 15 días de incubación, acentuándose hacia el día 35, cuando se manifestaron claras diferencias en la formación de hojas, elongación del tallo, desarrollo radicular y presencia de callosidad basal. Esta respuesta temprana sugiere que los explantes perciben y responden rápidamente a las condiciones hormonales y osmóticas del medio, activando rutas metabólicas y morfogénicas específicas según el balance de los factores evaluados. La observación visual del crecimiento diferencial permitió corroborar, de manera cualitativa, la influencia determinante de la interacción entre BAP y sacarosa sobre el destino morfogénico de los explantes, estableciendo las bases para el análisis cuantitativo de las variables evaluadas.

Efecto de la sacarosa y la benciladenina en la supervivencia de *C. morifolium* en cultivo *in vitro*

El análisis de la supervivencia de los explantes reveló una amplia variabilidad entre tratamientos, con un promedio general de 57.2% (Tabla 1). El tratamiento T4 (0.5 mg L⁻¹ de BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa) destacó significativamente al alcanzar el 100% de supervivencia, superando ampliamente al testigo (T10) que presentó 62.5%. Este resultado demuestra que la combinación de una concentración moderada de BAP con un nivel estándar de sacarosa proporciona las condiciones óptimas para mantener la viabilidad celular y promover la regeneración organizada de los explantes. La respuesta observada en T4 puede atribuirse a un balance favorable entre la señalización hormonal inducida por la citocinina y la disponibilidad energética proporcionada por la sacarosa, lo que activa rutas fisiológicas asociadas a la división celular, la regeneración de tejidos y la resistencia al estrés propio

del establecimiento *in vitro* (Miraval, 2017; Zhang *et al.*, 2023).

En contraste, el tratamiento T3 (0.0 mg L⁻¹ de BAP y 60 g L⁻¹ de sacarosa) presentó la menor supervivencia (12.5%), lo que evidencia el efecto perjudicial de la combinación de ausencia de citocinina con alta concentración de sacarosa. Este fenómeno puede explicarse por dos mecanismos complementarios. En primer lugar, la elevada concentración de sacarosa (60 g L⁻¹) genera un fuerte estrés osmótico en los explantes, alterando el potencial hídrico del medio y dificultando la absorción de agua y nutrientes esenciales, lo que conduce a un desequilibrio fisiológico que compromete la viabilidad celular (Alejandro-Torres, 2022). En segundo lugar, la ausencia total de BAP impide la estimulación de la división celular y la activación de respuestas adaptativas al estrés, dejando a los explantes sin los mecanismos necesarios para contrarrestar las condiciones adversas del medio (Zhang *et al.*, 2023).

Los tratamientos T5 (0.5 mg L⁻¹ BAP y 45 g L⁻¹ sacarosa) y T6 (0.5 mg L⁻¹ BAP y 60 g L⁻¹ sacarosa) mostraron supervivencias de 84.0% y 70.9% respectivamente, lo que indica que, si bien la concentración moderada de BAP (0.5 mg L⁻¹) mantiene un efecto protector, el incremento en la concentración de sacarosa por encima de 30 g L⁻¹ comienza a ejercer un efecto negativo sobre la viabilidad. Esta tendencia confirma que el estrés osmótico inducido por altas concentraciones de sacarosa puede contrarrestar parcialmente los efectos benéficos de la citocinina, tal como lo señalan Mamani y Quispe (2024), quienes reportaron que concentraciones superiores a 30 g L⁻¹ de sacarosa dificultan el transporte activo de solutos y afectan negativamente la fisiología del tejido vegetal.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y benciladenina (BAP) sobre la supervivencia y callogénesis de explantes axilares de *Chrysanthemum morifolium* variedad Indianápolis cultivados *in vitro* durante 70 días.

Tratamiento	Sacarosa (g L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	Supervivencia (%)	Explantes con callo (%)
T1	30.0	0.0	55.0	70.8
T2	45.0	0.0	25.0	50.0
T3	60.0	0.0	12.5	95.8
T4	30.0	0.5	100.0	33.3
T5	45.0	0.5	84.0	35.0
T6	60.0	0.5	70.9	45.8
T7	30.0	1.0	62.5	54.1
T8	45.0	1.0	66.6	33.3
T9	60.0	1.0	33.4	41.6
T10*	40.0	1.0 (kinetina)	62.5	54.1
\bar{x}			57.2	45.9

Los valores de supervivencia y callogénesis se expresan como porcentaje respecto al total de explantes evaluados por tratamiento (n = 24 explantes por tratamiento, distribuidos en tres repeticiones con ocho explantes cada una). *Tratamiento testigo correspondiente al medio de cultivo estandarizado para *Chrysanthemum* spp. con kinetina (1.0 mg L⁻¹) como fuente de citocinina.

Por otra parte, los tratamientos con BAP 1.0 mg L⁻¹ (T7, T8 y T9) presentaron supervivencias de 62.5%, 66.6% y 33.4% respectivamente, evidenciando que el incremento en la concentración de BAP no necesariamente se traduce en una mayor viabilidad, especialmente cuando se combina con altos niveles de sacarosa. Este comportamiento puede deberse a un exceso de señalización citocinínica que desencadena respuestas desreguladas, incluyendo la inducción prematura de procesos de senescencia o la activación de rutas metabólicas que desvían recursos hacia la formación de callo en lugar de la regeneración organizada (Bhatla y Lal, 2018). La disminución drástica en T9 (33.4%) al combinar la máxima concentración de BAP con la máxima concentración de sacarosa ejemplifica claramente este efecto antagónico.

Los resultados obtenidos demuestran que la supervivencia de los explantes de crisantemo *in vitro* depende críticamente de una interacción sinérgica y dosis-dependiente entre la concentración de sacarosa y BAP. Niveles moderados de ambos factores (0.5 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ sacarosa) maximizan la viabilidad, mientras que desequilibrios en cualquiera de los dos componentes comprometen la supervivencia. Esta información resulta fundamental para el diseño de protocolos de micropropagación que prioricen la obtención de un alto número de explantes viables desde las etapas iniciales del cultivo.

Efecto de la sacarosa y la benciladenina en la callogénesis de *C. morifolium* en cultivo *in vitro*

La formación de callo en la base de los explantes constituye una respuesta morfogénica alternativa a la organogénesis directa, cuyo control es esencial para dirigir el desarrollo hacia la regeneración de brotes. En el presente estudio, el porcentaje promedio de callosidad fue de 45.9%, con una marcada variabilidad entre tratamientos (Tabla 1). El tratamiento T3 (0.0 mg L⁻¹ BAP y 60 g L⁻¹ sacarosa) presentó el valor más elevado (95.8%), mientras que el T4 (0.5 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ sacarosa) registró el más bajo (33.3%), evidenciando una relación inversa entre la presencia de BAP en concentración moderada y la inducción de callo.

La elevada callogénesis observada en T3 puede interpretarse como una respuesta de estrés de los explantes ante las condiciones osmóticas extremas generadas por la alta concentración de sacarosa (60 g L⁻¹). Diversos autores han documentado que concentraciones elevadas de sacarosa inducen estrés osmótico y metabólico en los tejidos vegetales, activando mecanismos de defensa que incluyen la desdiferenciación celular y la proliferación de tejido no organizado como estrategia de supervivencia (Karim *et al.*, 2003; Koch, 2004; Hussein *et al.*, 2017). La

ausencia de BAP en este tratamiento impide que la división celular sea canalizada hacia la formación organizada de brotes, derivando en un crecimiento celular descontrolado que se manifiesta como callo.

Babiker *et al.* (2021) reportaron hallazgos similares en crisantemo variedad 'Zembla yellow', donde altas concentraciones de sacarosa promovieron la formación de callo, asociando este fenómeno con el estrés metabólico que dificulta la absorción adecuada de reguladores de crecimiento y vitaminas esenciales. En condiciones de alta presión osmótica, la demanda energética del explante se ve sobrepasada, generando un desbalance en las rutas anabólicas y catabólicas que conduce a la acumulación de compuestos fenólicos y a la creación de un entorno fisiológico propicio para la callogénesis.

En contraposición, la baja callosidad registrada en T4 (33.3%) indica que la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP con 30 g L⁻¹ de sacarosa favorece la regeneración directa y organizada de los tejidos, limitando la proliferación de células indiferenciadas. Este comportamiento puede explicarse por el equilibrio hormonal favorable proporcionado por la dosis moderada de BAP, que estimula la diferenciación y desarrollo de brotes en lugar de la proliferación celular no específica (Alejandro-Torres, 2022). La presencia de BAP en concentración adecuada permite que la energía y los nutrientes disponibles sean canalizados hacia rutas morfogénicas organizadas, en lugar de destinarse a la formación de callo.

Resulta interesante observar que los tratamientos con BAP 1.0 mg L⁻¹ (T7, T8 y T9) mostraron porcentajes de callosidad intermedios (54.1%, 33.3% y 41.6% respectivamente), lo que sugiere que concentraciones elevadas de citocinina pueden, en algunos casos, inducir proliferación celular no dirigida, especialmente en ausencia de un balance adecuado con auxinas endógenas o exógenas. Kharel *et al.* (2022) señalaron que las citocininas en exceso promueven una proliferación celular no organizada cuando no se acompañan de una proporción adecuada de auxinas, lo que explicaría los valores de callosidad observados en estos tratamientos.

El comportamiento observado en T8 (45 g L⁻¹ sacarosa y 1.0 mg L⁻¹ BAP), con una callosidad relativamente baja (33.3%) similar a la de T4, sugiere que, en determinadas combinaciones, el incremento en la concentración de BAP puede compensar parcialmente el efecto inductor de callo de concentraciones moderadamente elevadas de sacarosa, manteniendo la morfogénesis organizada.

En conjunto, estos resultados demuestran que la formación de callo en *C. morifolium* está determinada por la interacción entre la concentración de sacarosa y

BAP. Altas concentraciones de sacarosa inducen una respuesta de estrés que promueve la desdiferenciación celular, mientras que niveles óptimos de BAP (0.5 mg L^{-1}) pueden contrarrestar este efecto y dirigir el desarrollo hacia una regeneración organizada. La optimización del medio de cultivo debe, por tanto, considerar cuidadosamente este balance para minimizar la callogénesis indeseada y maximizar la regeneración efectiva de brotes.

Efecto de la sacarosa y la benciladenina en el número de hojas de *C. morifolium* en cultivo *in vitro*

El número de hojas por explante constituye un indicador fundamental de la capacidad organogénica y del potencial de crecimiento de los brotes regenerados. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), con el tratamiento T4 (0.5 mg L^{-1} BAP y 30 g L^{-1} sacarosa) presentando el valor más elevado (6.2 hojas por explante), superando estadísticamente al resto de los tratamientos según la prueba de Tukey (Tabla 2). Este resultado posiciona a T4 como la combinación más efectiva para promover el desarrollo foliar en crisantemo *in vitro*.

La superioridad de T4 en la inducción de hojas puede explicarse por la acción concertada de la BAP como estimulador de la división celular y la diferenciación de tejidos foliares, junto con la disponibilidad energética proporcionada por una concentración moderada de sacarosa que no induce estrés osmótico. Zalewska, Lema-Rumińska y Miler (2007) documentaron que las citocininas, particularmente la BAP, activan la expresión de genes involucrados en la organogénesis de brotes y la expansión foliar, efecto que se potencia cuando las condiciones osmóticas del medio son favorables. Naing *et al.* (2014) corroboraron estos hallazgos en crisantemo, reportando que concentraciones de BAP entre 0.5 y 1.0 mg L^{-1} , combinadas con 30 g L^{-1} de sacarosa, optimizan la regeneración de brotes y el desarrollo foliar.

Los tratamientos T5 (0.5 mg L^{-1} BAP y 45 g L^{-1} sacarosa) y T6 (0.5 mg L^{-1} BAP y 60 g L^{-1} sacarosa) presentaron valores intermedios de 4.6 y 4.3 hojas respectivamente, ubicándose en un rango estadístico inferior al de T4 pero superior a los tratamientos sin BAP. Esta tendencia decreciente en el número de hojas a medida que aumenta la concentración de sacarosa, manteniendo constante la BAP en 0.5 mg L^{-1} , confirma que el estrés osmótico inducido por altas concentraciones de sacarosa afecta negativamente la organogénesis foliar, incluso en presencia de una concentración adecuada de citocinina.

En contraste, los tratamientos con ausencia de BAP (T1, T2 y T3) registraron los valores más bajos de

número de hojas (2.0, 1.1 y 0.2 respectivamente), evidenciando que la presencia de una citocinina exógena es indispensable para inducir la formación de hojas en los explantes axilares de crisantemo. La drástica reducción en T3 (0.2 hojas) refleja el efecto combinado de la ausencia de BAP y el severo estrés osmótico generado por 60 g L^{-1} de sacarosa, condiciones que prácticamente inhiben por completo la organogénesis foliar.

Los tratamientos con BAP 1.0 mg L^{-1} (T7, T8 y T9) mostraron valores de 3.8, 2.7 y 2.0 hojas respectivamente, inferiores a los obtenidos con 0.5 mg L^{-1} de BAP en combinaciones equivalentes de sacarosa. Este comportamiento sugiere que concentraciones supraóptimas de BAP pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la diferenciación foliar, posiblemente debido a una desregulación en los procesos de división celular que desvía recursos hacia la proliferación de tejido no organizado o hacia la formación de estructuras anormales (Bhatla y A. Lal, 2018).

El testigo (T10), con kinetina 1.0 mg L^{-1} y sacarosa 40 g L^{-1} , presentó un promedio de 1.1 hojas, estadísticamente similar a los tratamientos sin BAP y significativamente inferior a T4. Este resultado indica que, en las condiciones evaluadas, la kinetina es menos efectiva que la BAP para promover el desarrollo foliar en esta variedad de crisantemo, lo que justifica la exploración de citocininas alternativas para optimizar los protocolos de micropropagación.

Los resultados obtenidos demuestran que la inducción de hojas en crisantemo *in vitro* depende críticamente de la presencia de BAP en concentración adecuada (0.5 mg L^{-1}) y de un nivel de sacarosa que no genere estrés osmótico (30 g L^{-1}). La combinación T4 emerge como la más eficiente para maximizar el desarrollo foliar, lo que tiene implicaciones directas en la calidad de los brotes regenerados y en su capacidad para sobrevivir en etapas posteriores de aclimatación.

Efecto de la sacarosa y la benciladenina en la longitud del tallo de *C. morifolium* en cultivo *in vitro*

La elongación del tallo es una variable crítica en la micropropagación, ya que determina la calidad morfológica de los brotes y su aptitud para el enraizamiento y la aclimatación. El análisis de la longitud del tallo reveló diferencias significativas entre tratamientos, con T4 (0.5 mg L^{-1} BAP y 30 g L^{-1} sacarosa) alcanzando el valor más alto (15.7 mm), seguido por T5 (10.7 mm), T7 (10.0 mm) y T6 (8.4 mm), todos ellos con concentraciones de BAP entre 0.5 y 1.0 mg L^{-1} (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y benciladenina (BAP) sobre el número de hojas, longitud del brote principal y longitud de raíz en explantes axilares de *Chrysanthemum morifolium* variedad Indianápolis cultivados *in vitro* durante 70 días.

Tratamiento	Sacarosa (g L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	Número de hojas	Longitud de tallo (mm)	Longitud de raíz (mm)
T1	30.0	0.0	2.0 ± 0.3 a	5.5 ± 0.7 a	0.0 ± 0.0 a
T2	45.0	0.0	1.1 ± 0.2 a	3.6 ± 0.5 a	0.5 ± 0.1 a
T3	60.0	0.0	0.2 ± 0.1 a	2.8 ± 0.4 a	0.9 ± 0.2 a
T4	30.0	0.5	6.2 ± 0.5 c	15.7 ± 1.2 c	7.5 ± 1.1 b
T5	45.0	0.5	4.6 ± 0.4 b	10.7 ± 0.9 c	0.0 ± 0.0 a
T6	60.0	0.5	4.3 ± 0.4 b	8.4 ± 0.8 b	0.2 ± 0.1 a
T7	30.0	1.0	3.8 ± 0.3 b	10.0 ± 0.9 c	4.7 ± 0.8 b
T8	45.0	1.0	2.7 ± 0.3 b	6.6 ± 0.6 a	0.0 ± 0.0 a
T9	60.0	1.0	2.0 ± 0.2 a	6.8 ± 0.7 a	2.3 ± 0.5 b
T10*	40.0	1.0 (kinetina)	1.1 ± 0.2 a	5.9 ± 0.6 a	2.2 ± 0.4 b

Los valores representan la media ± error estándar (EE) de 24 explantes por tratamiento (n = 24). Medias seguidas por la misma letra dentro de cada columna no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$). *Tratamiento testigo correspondiente al medio de cultivo estandarizado para *Chrysanthemum* spp. con kinetina (1.0 mg L⁻¹) como fuente de citocinina.

La máxima elongación observada en T4 confirma que la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP con 30 g L⁻¹ de sacarosa proporciona el equilibrio óptimo entre estimulación hormonal y disponibilidad energética para promover el crecimiento en longitud del tallo. Hussein *et al.* (2017) reportaron resultados consistentes en cultivos de crisantemo, donde concentraciones moderadas de citocininas acompañadas de niveles estándar de sacarosa estimularon la formación de brotes múltiples con elongación activa. Este fenómeno se explica por la acción de las citocininas sobre la división celular en los meristemos apicales y subapicales, combinada con la expansión celular facilitada por la turgencia adecuada y la disponibilidad de fotosintatos provenientes del metabolismo de la sacarosa (Naing *et al.*, 2014).

Los tratamientos T5 y T7, con longitudes de tallo de 10.7 y 10.0 mm respectivamente, no mostraron diferencias estadísticas con T4, lo que indica que existe un rango de concentraciones de BAP (0.5-1.0 mg L⁻¹) capaz de promover la elongación del tallo cuando se combina con niveles de sacarosa que no excedan 45 g L⁻¹. Sin embargo, es importante notar que T5 y T7 presentaron un número de hojas significativamente inferior al de T4 (4.6 y 3.8 vs 6.2), lo que sugiere que la elongación del tallo y la proliferación foliar pueden estar reguladas de manera diferencial por las concentraciones de BAP y sacarosa.

El tratamiento T6 (0.5 mg L⁻¹ BAP y 60 g L⁻¹ sacarosa) presentó una longitud de tallo de 8.4 mm, significativamente inferior a T4, evidenciando el efecto inhibitorio del estrés osmótico sobre la elongación celular incluso en presencia de una concentración adecuada de BAP. Este resultado concuerda con lo señalado por Koch (2004) y Karim *et al.* (2003), quienes documentaron que condiciones

osmóticas desfavorables afectan la elongación celular al alterar los procesos de expansión mediados por la turgencia y la síntesis de componentes de pared celular.

En el extremo opuesto, los tratamientos sin BAP (T1, T2 y T3) presentaron las menores longitudes de tallo (5.5, 3.6 y 2.8 mm respectivamente), confirmando que la presencia de citocinina exógena es indispensable para inducir la elongación del tallo en explantes axilares de crisantemo. La reducción progresiva en la longitud del tallo a medida que aumenta la concentración de sacarosa en ausencia de BAP (T1→T2→T3) refleja nuevamente el efecto negativo del estrés osmótico sobre el crecimiento.

El testigo (T10) presentó una longitud de tallo de 5.9 mm, estadísticamente similar a los tratamientos sin BAP y significativamente inferior a T4, lo que refuerza la observación previa sobre la mayor efectividad de la BAP frente a la kinetina para promover el crecimiento vegetativo en esta variedad.

Los resultados obtenidos demuestran que la elongación del tallo en crisantemo *in vitro* está determinada por la interacción entre BAP y sacarosa, siendo la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa la más efectiva para maximizar esta variable. La información generada tiene implicaciones prácticas para el diseño de protocolos de micropropagación que busquen obtener brotes de mayor calidad morfológica para etapas posteriores de enraizamiento y aclimatación.

Efecto de la sacarosa y la benciladenina en la longitud de raíz de *C. morifolium* en cultivo *in vitro*

El desarrollo radicular en la fase de multiplicación de brotes es generalmente limitado debido a la presencia de citocininas en el medio, las cuales inhiben la rizogénesis al establecer una relación auxina/citocinina desfavorable para la formación de raíces. En el presente estudio, únicamente el 10% del total de explantes desarrollaron raíces, concentrándose en aquellos tratamientos con 30 g L⁻¹ de sacarosa (T4, T7, T9 y T10), lo que sugiere que concentraciones moderadas de la fuente de carbono son más propicias para la iniciación radicular (Tabla 2).

El tratamiento T4 (0.5 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ sacarosa) presentó la mayor longitud de raíz (7.5 mm), seguido por T7 (1.0 mg L⁻¹ BAP y 30 g L⁻¹ sacarosa) con 4.7 mm, T9 (1.0 mg L⁻¹ BAP y 60 g L⁻¹ sacarosa) con 2.3 mm y T10 (testigo) con 2.2 mm. Aunque el análisis estadístico agrupó a estos cuatro tratamientos en el mismo rango (b), la tendencia observada indica que las combinaciones con 30 g L⁻¹ de sacarosa y concentraciones de BAP entre 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ son las más favorables para el desarrollo radicular, dentro del contexto general de baja rizogénesis.

La mayor longitud de raíz en T4 puede explicarse por un balance hormonal particular en el que la concentración moderada de BAP (0.5 mg L⁻¹) permite cierta expresión de la capacidad rizogénica endógena de los explantes, especialmente cuando las condiciones osmóticas son favorables (30 g L⁻¹ sacarosa). Kharel *et al.* (2022) documentaron que concentraciones de BAP inferiores a 1.0 mg L⁻¹ pueden, en algunos casos, no inhibir completamente el desarrollo radicular, permitiendo la expresión de la rizogénesis cuando otros factores del medio son favorables.

La ausencia de desarrollo radicular en tratamientos como T5, T6 y T8, a pesar de contener BAP en concentraciones de 0.5 o 1.0 mg L⁻¹, sugiere que concentraciones de sacarosa superiores a 30 g L⁻¹ ejercen un efecto inhibitorio adicional sobre la rizogénesis, posiblemente a través del estrés osmótico que dificulta la iniciación y elongación de las raíces. Bhatla y Lal (2018) y Kharel *et al.* (2022) señalaron que la homeostasis osmótica es fundamental para los procesos de división y elongación celular implicados en la formación de raíces, y su alteración puede bloquear completamente la rizogénesis.

Cruz *et al.* (2016) advirtieron que concentraciones de sacarosa por encima de 60 g L⁻¹ pueden inhibir el crecimiento de explantes por toxicidad osmótica y acumulación de compuestos fenolados, fenómeno que podría explicar la limitada formación radicular en T9 a pesar de contar con 30 g L⁻¹ de sacarosa, pero combinado con la máxima concentración de BAP (1.0

mg L⁻¹) y un período prolongado de cultivo que podría haber favorecido la acumulación de metabolitos secundarios inhibidores.

La ausencia de diferencias estadísticas marcadas entre los tratamientos que presentaron desarrollo radicular sugiere que el efecto de la BAP sobre el enraizamiento es indirecto y está más relacionado con su concentración relativa respecto a las auxinas endógenas del explante que con su concentración absoluta en el medio. Para promover un sistema radicular robusto en crisantemo, sería necesario considerar el subcultivo de los brotes regenerados a un medio de enraizamiento con una composición hormonal diferente, probablemente con la adición de una auxina como el ácido indolbutírico (AIB) o el ácido naftalenacético (ANA), y con concentraciones reducidas de sacarosa (20-30 g L⁻¹) que favorezcan la rizogénesis sin inducir estrés osmótico.

Integración de resultados e implicaciones para la micropropagación de crisantemo

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la morfogénesis *in vitro* de *C. morifolium* variedad Indianápolis está determinada por la interacción específica entre la concentración de BAP y sacarosa en el medio de cultivo. La combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP con 30 g L⁻¹ de sacarosa (T4) emergió consistentemente como la más favorable para promover la organogénesis directa, maximizando la supervivencia (100%), el número de hojas (6.2), la longitud del tallo (15.7 mm) y minimizando la callogénesis indeseada (33.3%). Este tratamiento proporciona el equilibrio óptimo entre la señalización hormonal inducida por la citocinina y las condiciones osmóticas favorables que permiten la expresión del potencial morfogénico de los explantes.

Por el contrario, la ausencia de BAP combinada con altas concentraciones de sacarosa (T3) indujo una respuesta de estrés que se manifestó en alta callogénesis (95.8%), baja supervivencia (12.5%) y prácticamente nula organogénesis, demostrando que la presencia de citocinina exógena es indispensable para dirigir el desarrollo hacia la formación de brotes. Asimismo, concentraciones supraóptimas de BAP (1.0 mg L⁻¹) tendieron a reducir el número de hojas y la longitud del tallo en comparación con 0.5 mg L⁻¹, indicando la existencia de un rango óptimo de concentración para esta variedad.

La limitada rizogénesis observada en todos los tratamientos confirma que la fase de multiplicación de brotes no es adecuada para inducir el enraizamiento, y que se requiere una etapa específica de enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* para completar el proceso de micropropagación. Futuros estudios deberían enfocarse en evaluar la respuesta de los brotes

regenerados en T4 a diferentes concentraciones de auxinas y sacarosa durante la fase de enraizamiento, así como en optimizar las condiciones de aclimatación para maximizar la supervivencia y el crecimiento en condiciones *ex vitro*.

Los hallazgos de esta investigación tienen implicaciones prácticas directas para la micropropagación comercial de crisantemo, al proporcionar una combinación hormonal y de fuente de carbono validada experimentalmente para la variedad Indianápolis. La implementación de este protocolo optimizado podría traducirse en una mayor eficiencia en la producción de material vegetal de alta calidad, reduciendo costos y tiempos de propagación, y contribuyendo a la competitividad del sector ornamental en el Estado de México y en el país.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra, con base en el objetivo planteado de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de benciladenina y sacarosa sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *C. morifolium* variedad Indianápolis, los resultados obtenidos permiten concluir que la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de BAP con 30 g L⁻¹ de sacarosa (T4) constituye el tratamiento más eficiente para promover la organogénesis directa en explantes axilares de crisantemo. Esta formulación generó el mayor porcentaje de supervivencia (100%), el máximo número de hojas por explante (6.2) y la mayor longitud de tallo (15.7 mm), con diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás tratamientos evaluados, lo que demuestra que el equilibrio entre una concentración moderada de citocinina y un nivel estándar de sacarosa proporciona las condiciones óptimas para la regeneración organizada de brotes.

La presencia de BAP en concentración moderada resultó indispensable para inducir la organogénesis de brotes, mientras que su ausencia se asoció con baja supervivencia (12.5 a 55.0%) y elevada formación de callo (hasta 95.8% en T3), independientemente de la concentración de sacarosa utilizada. Asimismo, se demostró que concentraciones elevadas de sacarosa (45 y 60 g L⁻¹) ejercen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo morfogénico, manifestado en reducción del número de hojas, menor longitud de tallo e incremento en la formación de callo, debido al estrés osmótico generado en los explantes.

En cuanto al desarrollo radicular, este fue limitado en todos los tratamientos, presentándose únicamente en el 10% de los explantes con longitudes de raíz que no superaron 7.5 mm, lo que indica que las condiciones evaluadas no son adecuadas para inducir rizogénesis y que se requiere una fase específica de enraizamiento con auxinas para completar el proceso de

micropropagación. Adicionalmente, la formulación estandarizada con kinetina resultó significativamente menos efectiva que la combinación óptima con BAP para promover el desarrollo vegetativo, lo que valida la elección de BAP como citocinina más adecuada para la micropropagación de esta variedad.

En síntesis, el protocolo que incorpora 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa en medio basal MS permite maximizar la eficiencia de la propagación *in vitro* de *C. morifolium* variedad Indianápolis, al favorecer la organogénesis directa con alta supervivencia y calidad morfológica de los brotes.

Funding. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that no competing interests exist.

Compliance with ethical standards. Does not apply

Data availability. Data are available with Dr. Reyes-Díaz (jesus.reyes@utvtol.edu.mx) upon reasonable request.

Author Contribution Statement (CRediT). **J.I. Reyes-Díaz** – Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **C. Zanabria-Gutiérrez** – Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation. **G. Ramírez-Zea** – Conceptualization, Project administration, Investigation, Resources.

REFERENCES

- Alejandro-Torres, E.O., 2022. Producción de brotes meristemáticos en bajas concentraciones de citocininas para la propagación *in vitro* de tomate, *Solanum lycopersicum*. [bachelorThesis] La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022. Available at: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/7538> [Accessed 22 May 2025].
- Babiker, Y.F.E., Elmokadem, H.E.M.G., 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), pp.123–132. <https://doi.org/10.21608/alexja.2021.209218>

- Bhatla, S.C. and Lal, M.A., 2018. Plant Physiology, Development and metabolism. [online] Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Cruz, Y.N., Chi-Sánchez, F., Uc-Vázquez, A. and Ramos-Díaz, A., 2016. *In vitro* regeneration and genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* var. micromargara). 1(1), pp.51–59.
- George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.-J.D. eds., 2007. Plant propagation by tissue culture. [online] Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Hazarika, B.N., 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Scientia Horticulturae, 108(2), pp.105–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- Hussein, H. a. A., Sharaf El-Din, M.N., Kasem, M.M. and Lotfy, E.A., 2017. Influence of some plant growth substances on shoot and root initiations of chrysanthemum explants *in vitro*. Journal of Plant Production, 8(1), pp.71–76. <https://doi.org/10.21608/jpp.2017.37816>
- Hwang, I., Sheen, J. and Müller, B., 2012. Cytokinin signaling networks. Annual Review of Plant Biology, 63(1), pp.353–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>
- Karim, M.Z., Amin, M.N., Azad, M. a. K., Begum, F., Rahman, M.M., Ahmad, S. and Alam, R., 2003. *In vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium* as affected by sucrose, agar and pH. Biotechnology, 2(2), pp.115–120. <https://doi.org/10.3923/biotech.2003.115.120>
- Kharel, P., Creech, M., Nguyen, C., Vendrame, W., Munoz, P. and Huo, H., 2022. Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on *in vitro* shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 58. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10299-0>
- Koch, K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology, 7(3), pp.235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Mamani, B. and Quispe, A.G., 2024. Efecto de diferentes tipos de enraizadores *in vitro* y sustratos en la aclimatación de *Zigopetalum maculatum* (Orchidaceae). Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 11(2), pp.65–73. <https://doi.org/10.53287/cqja1525qf10r>
- Martín, R., Chong-Pérez, B. and Pérez-Alonso, N., 2016. Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. Biotecnología Vegetal, 16(4), pp.195–206.
- Miraval, L.H., 2017. Efecto de dos concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la regeneración *in vitro* de meristemas florales de dos cultivares de *Musa* sp. [online] Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.14292/1130> [Accessed 22 May 2025].
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), pp.473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naing, A.H., Jeon, S.M., Han, J.-S., Lim, S.H., Lim, K.B. and Kim, C.K., 2014. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. Comptes Rendus. Biologies, 337(6), pp.383–390. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.03.005>
- Phillips, G.C. and Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(3), pp.242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Rojas-González, J.A., 2019. Fructosa-1,6-biofosfatasa cloroplastídica y citosólica: importancia en la síntesis y distribución de carbohidratos en plantas. [Doctoral thesis] Universidad de Granada. Available at: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/58142> [Accessed 22 May 2025].
- Salgado-Garciglia, R., 2014. La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. Saber más. Revista de divulgación. Available at: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html> [Accessed 22 May 2025].

- SIAP, 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Ciudad de México: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Teixeira Da Silva, J.A., Shinoyama, H., Aida, R., Matsushita, Y., Raj, S.K. and Chen, F., 2013. *Chrysanthemum* Biotechnology: Quo vadis? Critical Reviews in Plant Sciences, 32(1), pp.21–52. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.696461>
- Zalewska, M., Lema-Rumińska, J. and Miler, N., 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. Scientia Horticulturae, 113(1), pp.70–73. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.019>
- Zhang, Y., Guo, C., Hu, J., Liu, F., Fu, S., Guo, X., Chen, Q., Zhang, L., Zhu, L. and Hou, X., 2023. Effects of 6-Benzylaminopurine combined with prohexadione-ca on yield and quality of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Hangbaiju. Agriculture, 13(2), p.444. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020444>