



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

REGENERACIÓN *in vitro* DE  
*Dahlia brevis* Sorensen Y *Dahlia tenuicaulis*  
Sorensen, ESPECIES ENDÉMICAS DE  
MÉXICO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ARIANA ISTAR VALDÉS VELÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

COMITÉ TUTORAL: DR. ROBERT BYE BOETTLER  
DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**


**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **VALDÉS VELÁZQUEZ ARIANA ISTAR** con número de cuenta **98188231** con la tesis titulada **“Regeneración *in vitro* de *Dahlia brevis* Sorensen y *Dahlia tenuicaulis* Sorensen, especies endémicas de México”**, realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA:**

Presidente: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER  
Vocal: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Secretario: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA  
Suplente: M. en C. JOSÉ MERCED MEJÍA MUÑOZ  
Suplente: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG DE ESPINDOLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de abril de 2010.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad y el apoyo otorgado para la realización de mis Estudios de Maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca concedida que permitió el inicio, desarrollo y culminación exitosa de este intenso trabajo.

De manera muy particular, agradezco al Comité Tutorial el interés, dedicación y esfuerzo conjunto para culminar este trabajo que juntos hemos realizado, y que sin su apoyo no hubiera sido posible.

Dra. Rachel Mata Essayag

Dr. Robbert Bye Boettler

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Esta Tesis está dedicada

A ti primo, porque sigues y siempre estarás aquí.

A mis padres Hortensia y César, mi abuela Catalina y mi hermano César Yaroslav.

A mis hermanitos Neto y Frida.

A Ingrid, Gabi, Pedro y Luís.

A Daniel.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México el permitirme ser parte de ella y seguirme desarrollando en mi vida académica y personal dentro de sus peculiares aulas y hermosos jardines.

Así mismo, reconozco la disponibilidad otorgada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, para la realización de este trabajo. Agradezco al Jardín Botánico y a la inmensa belleza de sus plantas el haberme dado la oportunidad de hacer de ambos, mi casa.

Agradezco al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila su apoyo para la realización de esta tesis, así como su amabilidad e interés por mi desarrollo, no sólo profesional, sino también personal. Muchas gracias asesor por todas sus enseñanzas, por sus consejos, por su cariño, por confiar en este estudio, por confiar en mí. GRACIAS.

Gracias a la Dra. Rachel Mata, quien me brindó la oportunidad de realizar parte de este estudio bajo su tutoría. Dra. Gracias por su amabilidad, por creer en este trabajo, estar siempre pendiente y compartirme una pequeña parte de todo el conocimiento que usted posee y que me permitió desarrollar día a día una gran admiración por usted.

Dr. Bye, gracias por enseñarme a amar a las dalias, por promover el conocimiento tan valioso de las comunidades indígenas y brindarles el reconocimiento que éstas merecen. Gracias por su amabilidad, interés y dedicación hacia este trabajo, gracias por enseñarme tanto y permitirme tener el orgullo de ser su alumna.

Así mismo, agradezco a los miembros del Jurado: Dr. Ricardo Reyes-Chilpa y M. en C. José Mejía Muñoz por su interés, su trato siempre cordial y sus oportunos comentarios que hicieron de éste, un mejor trabajo.

También agradezco a la Biól. Bárbara Estrada la ayuda y disponibilidad otorgada para la realización de este estudio en el campo del Cultivo de Tejidos Vegetales.

Agradezco enormemente a la Dra. Araceli Pérez, su amabilidad, disposición, conocimiento, tiempo y dedicación durante el desarrollo del estudio químico que permitió la culminación de esta Tesis.

Doy mi agradecimiento a la Licenciada Georgina Ortega Leite, Coordinadora de Bibliotecas del Instituto de Biología, UNAM, por las facilidades otorgadas y la

ayuda brindada durante la búsqueda bibliográfica indispensable para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco profundamente la ayuda otorgada por el Señor Raul Antonio Valdéz García, también su inmensa amabilidad y cariño.

Gracias a Rocío González Acosta y Lilia Jiménez su entera dedicación, interés, respeto, deposición y amabilidad que nos permiten, a los estudiantes del Posgrado en Ciencias Biológicas, realizar todo lo necesario para desarrollar nuestro estudio sin trabas.

Agradezco a mis maestros de aula y de vida, por enseñarme a amar lo que hago: Margarita Ponce, María Eugenia Muñiz, Sonia Vázquez, Alicia Brechú, Ricardo Reyes-Chilpa, María del Carmen Uribe, Roberto Martínez, Manuel Miranda, Víctor Chávez y Judith Márquez.

Maru y Ramiro Cruz, gracias a ambos por darme la oportunidad de desarrollarme en otra hermosa y reconfortante faceta de la biología, gracias por permitirme convertirme en Profesora de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Maru gracias a ti especialmente por quererme y convertirme en mi maestra y mentora, además de ser una amiga admirable. Te quiero.

A mis amigas y compañeras del laboratorio, Dalia y Betzy, con quienes no sólo he compartido el trabajo, sino innumerables anécdotas, risas y llantos. Por hacer feliz mi estancia en el laboratorio, por la confianza y ser mi apoyo en tantos momentos difíciles. Dalia, gracias por ayudarme durante el desarrollo de esta tesis, desde el inicio hasta el final, por tus consejos académicos y personales, por ser mi maestra además de una maravillosa amiga. Gracias Betzy por tus sonrisas, por tus palabras siempre reconfortantes y tu singular alegría. Gracias Lupita por ser mi amiga y por confiar en mí. Gracias Rocío por el apoyo, por tu linda presencia y amistad. A las cuatro por ser tan hermosas en toda la extensión de la palabra.

A Horacio, Arturo, Sergio, Kin, Alejandro, Jesus y Germán, gracias por TODO, por hacer el trabajo divertido, por escucharme y permitirme escucharlos. Gracias Axiote por ser un excelente amigo y confidente.

Gracias Barbarita, por escucharme, por tus consejos, por tus abrazos, por tus sonrisas, por tu calidez. Gracias por ser mi maestra y amiga, por creer en mí, te quiero.

Gracias a mis niños del CCH, Rocío, Daniel y Karen, quienes mostraron gran interés para el desarrollo de este trabajo, y sin su ayuda, no se hubiera terminado a tiempo. Gracias a Frida y Lalo por su ayuda también.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Gerardo, Alejandra P., Alejandra F., Alfonso, Mariana, Mari Carmen, Paulina y Mari.

Gracias Ara por enseñarme a amar a la fitoquímica, por ser tan inteligente y admirable. Gracias por ser tan amable y tener el interés para realizar este trabajo, por ser tan honesta.

A mis compañeros de laboratorio, quienes siempre fueron amables y mostraron gran disponibilidad para enseñarme y ayudarme en el trabajo: Isa, Viris, Sol, Sonia, Pepe, Abraham, Marta, Mario, Lupita, Fer, Krutz y Gerardo. Gracias especialmente a Viris por sus consejos, por prestarme su espacio, gracias por todo Viris.

Agradezco a mis padres, a ambos por enseñarme a construir un gran edificio, saber que puede caer, pero que su restauración puede originar dos construcciones más sólidas y fuertes. A los dos por haberme educado con constancia y mucho esfuerzo, por hacerme una persona coherente con mis actos y defensora de lo que creo, es justo. Por haberme dado todo para cumplir mi sueño de ser estudiante, espero poder retribuirles de alguna forma lo que ustedes, sin pedir nada a cambio, me han dado.

Mamá, gracias por ser tan hermosa e inteligente, por dejarme ver en ti a una mujer vulnerable pero con una gran fortaleza que le permite luchar contra todo, y levantarnos a todos también. Gracias por ser una gran deportista y ganadora en TODO lo que haces, por ser un gran ejemplo y permitirme jactarme de ser tu hija y decir con orgullo que me parezco a ti. Soy tu más grande admiradora, te amo y cuando sea grande ¡quiero ser como tú!

Papá, gracias por ser tan amoroso, por enseñarme a llorar y expresar mis sentimientos, por ser un hombre tan PERFECTO que se da el lujo de equivocarse. Gracias por dejarme tener un padre tan inteligente y guapo que pueda presumir con orgullo. Gracias por hacerme feliz dándome tu amor y tiempo, por enseñarme a disfrutar la vida. Por ser un ejemplo en casa y en el trabajo. Papi, te admiro y te amo, y nunca dejaré de hacerlo.

Hermanito, gracias por quererme, por escucharme, darme y tenerme confianza, por tus consejos, tus abrazos y sonrisas reconfortantes, por tu presencia que me hace sentir siempre protegida. Gracias por ser el hermano que



siempre quise tener, por ser parte de mí y ocupar ese sitio que a nadie más daría. Te amo y te admiro. Gracias Tania y Miris, por estar aquí y hacer de Yaritos un hombre feliz.

Abuela, gracias por alimentarme con tu deliciosa comida, pero principalmente por dar de comer, a eso que algunos llaman alma, con tus hermosas carcajadas que nos arrastran a todos como si fueran grandes olas de alegría, por tus platicas, por tu amor sin límites que de una u otra forma nos avientas sin cesar. Por ser el árbol del que todos nos detenemos en nuestros aciertos y fallas. Gracias por estar conmigo, por dejarme reír y llorar a tu lado, por las canastas. Abuela, gracias, eres una mujer admirable. Te amo y espero poder pagarte aunque sea un poco de lo mucho que tú me has dado.

Daniel, cariño mío, gracias por estar construyendo conmigo este camino que se bifurcó y formó dos taxa diferentes, pero que ahora han convergido, desarrollando una homoplasia que siempre estará ahí, contra cualquier predicción y fuerza evolutiva. Gracias por ser la luz que estimula la actividad de mis auxinas para dirigirme a ti, como planta que soy, para intentar alcanzarte y seguir viviendo. Gracias por ser mi amigo, por estar conmigo, gracias por hacerme tan feliz. Cielo, gracias por apoyarme, por ser mi confidente y psicólogo personal, por aceptarme, por perdonar todos mis errores y permitirme perdonar los tuyos, por ser parte de mí y de mi familia. Gracias por ser un gran ejemplo en mi vida. Te amo, gracias por corresponderme. Sabes que este trabajo también es tuyo.

Gracias a Neto y a Frida, quienes desde que llegaron a este mundo, no sólo son mis hermanos, sino también mi orgullo, una inspiración en mi vida, fuentes interminables de luz y fortaleza que me permiten seguir siempre adelante. Neto y Frida, gracias por las risas, los amo y los admiro...tanto. Gracias Ángeles por ser una hermosa mujer, por ser mi tía y mi madre, mi amiga y confidente. Gracias por apoyarme siempre. Gracias por ser una luchadora, por enseñarme que te puedes caer pero que te puedes levantar con más fuerza. Te admiro y te amo.

Gracias a Mare, por seguir adelante, por estar siempre ahí, por ser mi prima y amiga, por quererme y apoyarme, Mare, te quiero. Gracias a Pablo y Juan Carlos que han hecho de mi una mejor persona, por las platicas y los juegos. Gracias, los quiero.

Agradezco a mis tíos: Ernesto, Mela y Alex. A mi tía Paty por el respeto y cariño, por el apoyo, por tus consejos, ¡y claro!, por las canastas. Los quiero.

A mis tíos Argelia, Rosa y Felipe, gracias por su cariño, por su tiempo, por sus palabras compartidas. A mis primas Ilhui y Luna, a quienes quiero y admiro por ser unas mujeres bellas y exitosas. Ilhui, gracias por las risas, por las lágrimas, por todo eso que sigue aquí.

A María Guadalupe Carbajal y José Calixto Sánchez, gracias por todo su cariño, comprensión y apoyo. Gracias por abrirme las puertas de su hermosa familia, gracias por darme la oportunidad de conocerlos, admirarlos y quererlos.

Agradezco también a Clotario, Lucy, Alín y Dani, Iván y Dani, por ser mi otra familia.

Agradezco infinitamente a Ingrid y Gabi, mis dos más grandes amigas, mujeres maravillosas y hermosas. Gracias por quererme, estar conmigo, por la confianza, por TODO. Gracias por su amistad que ha crecido tanto y suele tornarse en hermandad.

Gracias a Luis, Pedro y Chucho, quienes con su alegría, contagian mi vida de felicidad, por permitirme compartir con ellos tantas vivencias, la mayoría hermosas, por su apoyo, por estar con Daniel y conmigo siempre. Gracias.

A Iris, Michel, Cinthya, Josué y Oziel, los cony ´s, quienes sin duda me han transformado, quienes llegaron para quedarse, quienes están ahí siempre, con los aplausos del momento. Los adoro, gracias amigos. Gracias Daniel Monsivais, por los desayunos, por tu cariño.

Gracias Fher y Adrian, gracias por ayudarme a salir cuando he caído, gracias por ser una gran alegría en mi vida. Marco, gracias por las sonrisas y todos los momentos felices. Los quiero y admiro mucho.

Agradezco a Amaranta, Itzel, César, Pablo, por su amistad. Gracias.

Gracias a mis entrenadoras Guillermina Oteíza y Graciela Arce por ser parte indispensable en mi formación como persona, por enseñarme a creer en mí, pero también en los demás.

**A Margarita Ponce, maestra y gran amiga. Gracias por tus consejos, enseñanzas y experiencias compartidas, pero sobre todo, gracias por tu sonrisa, gracias por estar con Gaby, Pedro, Daniel y conmigo. Te queremos.**

# TABLA DE CONTENIDOS

---

	Pág.
Índice de Tablas	III
Índice de Figuras	V
Resumen	IV
Summary	X
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
El Género <i>Dahlia</i>	5
Clasificación Taxonómica y Descripción del Género <i>Dahlia</i>	6
Clasificación Taxonómica y Descripción de <i>Dahlia brevis</i> y <i>Dahlia tenuicaulis</i>	7
Sección <i>Dahlia</i>	8
<i>Dahlia brevis</i> Sorensen	8
Sección <i>Pseudodendron</i>	9
<i>Dahlia tenuicaulis</i> Sorensen	9
Propiedades Alimenticias y Medicinales del Género <i>Dahlia</i>	12
Fitoquímica del Género <i>Dahlia</i>	16
Cultivo de Tejidos Vegetales	33
Métodos de Propagación	36
Etapas de la Micropropagación	39
Ventajas y Desventajas del Cultivo <i>in vitro</i>	40
Fitohormonas y Reguladores de Crecimiento	41
Auxinas	42
Citocininas	45
Interacción auxina-citocinina	48
Producción de Metabolitos Secundarios por Cultivo de Tejidos Vegetales	49
Cultivo <i>in vitro</i> de dalias	54
Desinfección del material biológico	54
Aislamiento y tamaño de los explantes	56
Regeneración de plantas y enraizamiento	57
Formación de callo	60
3. Justificación	64
4. Objetivos	65
Objetivo General	65
Objetivos Particulares	65
5. Hipótesis	66

---

---

6. Materiales y Métodos	67
Cultivo <i>in vitro</i>	67
Material biológico	67
Obtención de Explantes	68
Desinfección	68
Cultivo	68
Cultivos para regeneración de plantas	69
Cultivos para la formación de callo	70
Cultivo para la proliferación celular y de brotes a partir de callo	70
Enraizamiento	73
Aclimatización	73
Pruebas Preliminares	74
Desinfección de los explantes: <i>D. tenuicaulis</i>	74
Tamaño de los explantes	76
Medio de cultivo	77
Enraizamiento	78
Análisis Fitoquímico	79
Pruebas Preliminares	81
Extracción	81
Fase Móvil	82
Revelado	85
7. Resultados y Discusión	86
Cultivo <i>in vitro</i>	86
Evaluación del efecto hormonal sobre el crecimiento de las regiones apicales	86
Evaluación del efecto hormonal sobre la activación de yemas axilares y crecimiento de los brotes	105
Inducción de callo a partir de hojas	115
Inducción de callo a partir de entrenudos	131
Evaluación del efecto de auxinas y de carbón activado sobre la formación de raíces	147
Aclimatización	155
Análisis Fitoquímico	157
8. Conclusiones	165
9. Perspectivas	169
10. Anexos	171
Anexo 1	171
11. Bibliografía	172

---

# ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Poliacetilenos aislados en <i>Dahlia</i> spp. ....	<b>18</b>
<b>Tabla 2.</b> Flavonoides aislados en <i>Dahlia</i> spp. ....	<b>26</b>
<b>Tabla 3.</b> Otros metabolitos identificados en <i>Dahlia</i> spp. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 4.</b> Poliacetilenos obtenidos en cultivos <i>in vitro</i> ....	<b>50</b>
<b>Tabla 5.</b> Flavonoides obtenidos en cultivos <i>in vitro</i> ....	<b>51</b>
<b>Tabla 6.</b> Metabolitos secundarios obtenidos en cultivos <i>in vitro</i> de asteraceas ...	<b>53</b>
<b>Tabla 7.</b> Tratamientos utilizados para el establecimiento <i>in vitro</i> y regeneración de plantas a partir de regiones apicales y nudos .....	<b>71</b>
<b>Tabla 8.</b> Tratamientos utilizados para el establecimiento <i>in vitro</i> e inducción de callo a partir de hojas y entrenudos .....	<b>71</b>
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos utilizados en la inducción de un mayor crecimiento de callo y la formación de brotes a partir de éste .....	<b>72</b>
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos utilizados para la etapa de enraizamiento de los brotes obtenidos .....	<b>73</b>
<b>Tabla 11.</b> Referencias utilizadas para la detección de flavonoides en CCF .....	<b>81</b>
<b>Tabla 12.</b> Promedios de crecimiento de los brotes de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>94</b>
<b>Tabla 13.</b> Promedios de crecimiento de los brotes de <i>D. brevis</i> .....	<b>95</b>
<b>Tabla 14.</b> Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de nudos de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>96</b>
<b>Tabla 15.</b> Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de nudos de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de <i>D. brevis</i> .....	<b>97</b>
<b>Tabla 16.</b> Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de brotes de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>98</b>
<b>Tabla 17.</b> Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de brotes de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de <i>D. brevis</i> .....	<b>99</b>

<b>Tabla 18.</b>	Promedios de crecimiento de los brotes formados a partir de nudos de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>110</b>
<b>Tabla 19.</b>	Promedios de crecimiento de los brotes formados a partir de nudos de <i>D. brevis</i> .....	<b>111</b>
<b>Tabla 20.</b>	Promedio de formación de callos a partir de explantes de hoja de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>116</b>
<b>Tabla 21.</b>	Promedio de formación de callos a partir de explantes de entrenudos de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>132</b>
<b>Tabla 22.</b>	Promedios de formación de raíces en brotes cultivados .....	<b>152</b>
<b>Tabla 23.</b>	Fracciones obtenidas a partir de los extractos de <i>D. brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>158</b>
<b>Tabla 24.</b>	Referencias complementarias para el análisis en CCF .....	<b>158</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Dahlia brevis</i> Sorensen .....	9
<b>Figura 2.</b> <i>Dahlia tenuicaulis</i> Sorensen .....	10
<b>Figura 3.</b> Mapa de distribución de <i>Dahlia brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Estructuras químicas representativas de los metabolitos secundarios presentes en las dalias.....	17
<b>Figura 5.</b> Estructura química del ácido indol-3-acético y del ácido 2,4-diclorofenoxi acético .....	43
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la cinetina y de la bencil adenina .....	47
<b>Figura 7.</b> Concentraciones relativas de auxinas y citocininas necesarias para el crecimiento y morfogénesis de los cultivos <i>in vitro</i> .....	48
<b>Figura 8.</b> Raíces tuberosas y plantas de <i>D. tenuicaulis</i> .....	67
<b>Figura 9.</b> Explantes de hojas con clorosis y necrosis de <i>D. tenuicaulis</i> .....	74
<b>Figura 10.</b> Plagas encontradas en las plantas madre de <i>D. tenuicaulis</i> .....	75
<b>Figura 11.</b> Nudos y tallos de <i>D. tenuicaulis</i> contaminados después de 30 días de cultivo .....	75
<b>Figura 12.</b> Regiones apicales y nudos cultivados con crecimiento de brotes a partir de las yema axilares .....	76
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de las regiones apicales en medio de cultivo con carbón activado y PVP .....	77
<b>Figura 14.</b> Cultivo <i>in vitro</i> de <i>D. brevis</i> con formación de raíces tuberosas .....	78
<b>Figura 15.</b> Formación de raíces en brotes obtenidos a partir de explantes de la planta madre y brotes de cultivos establecidos <i>in vitro</i> .....	78
<b>Figura 16.</b> Método de detección de flavonoides y poliacetilenos en los callos de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	80
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de los extractos metanólico, metanólico acidulado, etanólico, y de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso ácido .....	82
<b>Figura 18.</b> Placas cromatográficas de las fracciones metanólica y etanólica, revelados con sulfato cérico y vainillina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	83

<b>Figura 19.</b>	Placas cromatográficas de las fracciones metanólica y etanólica revelados con sulfato cérico y vainillina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	<b>84</b>
<b>Figura 20.</b>	Cromatogramas en luz visible y luz UV, sin y con revelado con AlCl <sub>3</sub> .....	<b>85</b>
<b>Figura 21.</b>	Curvas de crecimiento de las regiones apicales de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>92</b>
<b>Figura 22.</b>	Curvas de crecimiento de las regiones apicales de <i>D. brevis</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 23.</b>	Gráficas de la regresión lineal de la longitud de los brotes de <i>D. tenuicaulis</i> comparadas con el número de nudos que éstos generan .....	<b>96</b>
<b>Figura 24.</b>	Gráficas de regresión lineal de la longitud de los brotes de <i>D. brevis</i> comparadas con el número de nudos que éstos generan .....	<b>97</b>
<b>Figura 25.</b>	Gráficas de regresión lineal de la longitud de los brotes de <i>D. tenuicaulis</i> comparadas con el número de brotes axilares que éstos generan .....	<b>98</b>
<b>Figura 26.</b>	Gráficas de la regresión lineal de la longitud de los brotes de <i>D. brevis</i> comparadas con el número de brotes axilares que éstos generan .....	<b>99</b>
<b>Figura 27.</b>	Brote hiperhidratado de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>101</b>
<b>Figura 28.</b>	Plantas y brotes regenerados a partir de regiones apicales <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>103</b>
<b>Figura 29.</b>	Curvas de crecimiento de los brotes provenientes de la activación de yemas axilares de los nudos de <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>108</b>
<b>Figura 30.</b>	Curvas de crecimiento de los brotes provenientes de la activación de yemas axilares de los nudos de <i>D. brevis</i> .....	<b>109</b>
<b>Figura 31.</b>	Brotes regenerados a partir de nudos de <i>D. tenuicaulis</i> , y <i>D. brevis</i> .....	<b>112</b>
<b>Figura 32.</b>	Callos formados a partir de nudos de <i>D. tenuicaulis</i> cultivados en medio basal y medio de origen .....	<b>113</b>
<b>Figura 33.</b>	Estructuras globulares, probablemente embriones somáticos y abundante formación de brotes .....	<b>114</b>
<b>Figura 34.</b>	Promedio de crecimiento de los callos formados a partir de explantes de hoja de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>117</b>
<b>Figura 35.</b>	Tejido íntegro de los explantes de hoja después de la formación de callo .....	<b>118</b>
<b>Figura 36.</b>	Organogénesis indirecta a partir del callo proveniente de hojas de <i>D. brevis</i> .....	<b>118</b>



<b>Figura 37.</b>	Curvas de crecimiento de los callos de hojas de <i>D. tenuicaulis</i> sometidos a subcultivo en medio basal, medio de origen, y medio con la citocinina de origen .....	<b>122</b>
<b>Figura 38.</b>	Curvas de crecimiento para los callos de hojas de <i>D. brevis</i> sometidos a subcultivo en medio basal, medio de origen, y medio con la citocinina de origen .....	<b>123</b>
<b>Figura 39.</b>	Curvas de crecimiento para los callos de hojas <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> sometidos a subcultivo en medio basal, medio de origen, y medio con la citocinina de origen .....	<b>124</b>
<b>Figura 40.</b>	Explante de hoja de <i>D. tenuicaulis</i> oxidado y necrosado .....	<b>125</b>
<b>Figura 41.</b>	Callos provenientes de los tratamientos 2, 2.1 y 2.2 de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>128</b>
<b>Figura 42.</b>	Callos de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> provenientes de los tratamientos 5, 3 y 9, y sus subcultivos .....	<b>128</b>
<b>Figura 43.</b>	Callos formados a partir de los explantes de hoja de <i>D. tenuicaulis</i> y sus subcultivos .....	<b>129</b>
<b>Figura 44.</b>	Callos formados a partir de los explantes de hoja de <i>D. brevis</i> y sus subcultivos .....	<b>130</b>
<b>Figura 45.</b>	Promedio de crecimiento de los callos formados a partir de explantes de entrenudos de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>132</b>
<b>Figura 46.</b>	Tejido íntegro de los entrenudos después de la formación de callo .....	<b>133</b>
<b>Figura 47.</b>	Organogénesis directa e indirecta a partir de entrenudos cultivados de <i>D. brevis</i> .....	<b>134</b>
<b>Figura 48.</b>	Curvas de crecimiento de los callos obtenidos a partir de tallos de <i>D. tenuicaulis</i> de los tratamientos 2, 5 y 7 y sus subcultivos .....	<b>137</b>
<b>Figura 49.</b>	Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de <i>D. tenuicaulis</i> de los tratamientos 4, 8 y 10 y sus subcultivos .....	<b>138</b>
<b>Figura 50.</b>	Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de <i>D. brevis</i> , sometidos a subcultivo .....	<b>139</b>
<b>Figura 51.</b>	Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de <i>D. brevis</i> , sometidos a subcultivo .....	<b>140</b>

<b>Figura 52.</b>	Callos provenientes de los tratamientos 2.1, 2.2, y 2 de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>143</b>
<b>Figura 53.</b>	Callos provenientes de los tratamientos 1, 3, 5, 7 y 9 de <i>D. tenuicaulis</i> y <i>D. brevis</i> .....	<b>144</b>
<b>Figura 54.</b>	Callos friables formados a partir de entrenudos de <i>D. tenuicaulis</i> de los tratamientos 4, 6, 8 y 10 y sus subcultivos .....	<b>145</b>
<b>Figura 55.</b>	Callos friables formados a partir de entrenudos de <i>D. brevis</i> de los tratamientos 4, 6, 8 y 10 y sus subcultivos .....	<b>146</b>
<b>Figura 56.</b>	Organogénesis de raíces, directa e indirecta como resultado de la adición de 2,4-D al medio de cultivo .....	<b>152</b>
<b>Figura 57.</b>	Regiones apicales de <i>D. tenuicaulis</i> sometidos a diferentes tratamientos de enraizamiento .....	<b>153</b>
<b>Figura 58.</b>	Regiones apicales de <i>D. brevis</i> sometidos a diferentes tratamientos de enraizamiento .....	<b>154</b>
<b>Figura 59.</b>	Ejemplares aclimatizados de <i>D. brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i> .....	<b>156</b>
<b>Figura 60.</b>	CCF de 7 extractos diferentes de <i>D. brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i> en luz visible y luz visible revelado con $\text{AlCl}_3$ .....	<b>163</b>
<b>Figura 61.</b>	CCF de 7 extractos diferentes de <i>D. brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i> bajo luz UV y luz UV revelado con $\text{AlCl}_3$ .....	<b>164</b>

## RESUMEN

México es centro de origen y diversificación del género *Dahlia*, posee gran importancia cultural, alimenticia y medicinal, y 32 de las 34 especies descritas son endémicas, por lo que ha sido considerado como la "Flor Nacional". *Dahlia tenuicaulis* es una especie arbustiva cuyas poblaciones son vulnerables, mientras que las de *Dahlia brevis*, especie herbácea, están erradicadas. Así, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la regeneración y propagación *in vitro* de dichas especies, basado en la generación de conocimientos morfogénéticos de éstas, así como detectar la posible formación de flavonoides y poliacetilenos, que permitan su conservación y sentar las bases para un aprovechamiento sostenible. Los explantes utilizados fueron regiones apicales, nudos, hojas inmaduras, y secciones de entrenudos, los cuales se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) al 50% adicionado con 500 mg/l de polivinilpirrolidona (PVP) y diferentes concentraciones de auxinas en combinación con citocininas. En análisis estadístico de los resultados obtenidos se evaluó mediante una prueba ANOVA y el análisis de comparación de medias de Tukey. Las regiones apicales y nudos se cultivaron con diferentes concentraciones de cinetina (Kin) y benciladenina (BA), las cuales inhibieron el crecimiento en longitud del eje principal pero indujeron la generación de brotes, además de inhibir la formación de raíces y promover la formación de antocianinas. En *D. tenuicaulis* se formaron abundantes embriones somáticos a partir de los nudos cultivados en el medio suplementado con 0.5 mg/L de BA. Los brotes obtenidos y aislados se trataron con ácido indol-3-acético (AIA), que indujo la formación de raíces pero redujo la longitud y ramificación de las mismas. El 80% de las plantas trasplantadas a *Sphagnum* o tierra de hoja sobrevivieron durante la etapa de aclimatización. Las hojas y entrenudos se cultivaron con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en combinación con diferentes concentraciones de Kin y BA, que promovieron la formación de callo en ambos explantes. El análisis fitoquímico, mediante cromatografía en capa fina y de gases acoplada a espectrometría de masas, indicó la formación de compuestos de tipo flavonoide en los callos generados a partir de hojas, plantas cultivadas *in vitro* y de invernadero, sin embargo los flavonoides previamente reportados en ambas especies no fueron detectados. No se reveló la formación de flavonoides en los callos regenerados a partir de segmentos de entrenudos. Este estudio representa un método biotecnológico exitoso de regeneración *in vitro*, que permite la obtención permanente de ejemplares para su estudio, uso alimenticio y medicinal, y así disminuir la explotación de las poblaciones naturales.

## SUMMARY

Mexico is center of origin and diversification of the genus *Dahlia*, owns great cultural, nutritional and medicinal importance, and 32 of the 34 species that constitute this genus are endemic, that is why it has been considered the "National Flower". *Dahlia tenuicaulis* is a bush species whose populations are vulnerable, whereas those of *Dahlia brevis*, herbaceous species, are eradicated. Thus, the objective of the present work was to establish an *in vitro* regeneration and propagation protocol of these species, based on the generation of morphogenetic knowledge of these, as well as to detect the possible formation of flavonoids and polyacetylenes, that allow their conservation and the establishment of the bases for a sustainable advantage. The used explants were apical regions, nodes, immature leaves, and sections of internodes, which were cultivated in 50% Murashige and Skoog (MS) medium added with 500 mg/l of polyvinylpyrrolidone (PVP) and various concentrations of auxins in combination with cytokinins. The statistic analysis of the obtained results was evaluated by means of ANOVA test and the analysis of comparison of averages of Tukey. The apical regions and nodes were cultivated with different concentrations from kinetin (Kin) and benzyladenine (BA), which inhibited the growth in length of the main axis but they induced the generation of shoots, and inhibiting the root formation and promoting the anthocyanin synthesis. Abundant somatic embryos were formed in *D. tenuicaulis* nodes cultures supplemented with 0.5 mg/l of BA. The obtained and isolated shoots were dealt with indol-3-acetic acid (IAA), that induced the root formation but it reduced to the length and ramification of those. 80% of the transplanted plants to *Sphagnum* or leaf soil survived during the acclimatization stage. The leaves and internodes were cultivated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with different concentrations from Kin and BA, that promoted the formation of callus in both explants. The phytochemical analysis, by means of thin layer chromatography and of gas chromatography coupled to mass spectrometry, indicated the formation of flavonoids-like compounds in the calluses generated from leaves, greenhouse and *in vitro* plants, the flavonoids previously reported in both species were not detected. The formation of flavonoids in the calluses regenerated from segments of internodes was not revealed. This study represents a successful biotechnological method of *in vitro* regeneration, that allows the permanent obtaining of biological units for its study, nutritional and medicinal use, and thus to diminish the natural populations exploitation.

# 1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países que presenta mayor diversidad biológica en el mundo como consecuencia de su compleja historia geológica que ha resultado en una posición geográfica particular y la formación de una topografía accidentada, y por lo tanto en una amplia variedad de climas, que en conjunto han permitido el desarrollo de una pluralidad de ecosistemas, perteneciendo así al grupo de los pocos países llamados megadiversos que, en América, incluye a Brasil, Colombia, Estados Unidos y Perú, entre otros (Chapela y Ortiz, 2006). Así, se estima que del 10 al 12% de aproximadamente 30 millones de especies existentes, se encuentra en nuestro país, habiéndose descrito alrededor de 24 mil 800 especies de plantas vasculares, es decir, el 9% de las especies descritas en el mundo, de las cuales 40-60% son endémicas, ocupando así el 5to lugar entre los países con mayor riqueza florística a pesar de que el inventario biológico no ha sido culminado (SEMARNAT, 2008).

México, además es un importante centro de origen de especies cultivadas y silvestres, estimándose que más del 15% de las especies vegetales que se consumen en el mundo tuvieron su origen en México y que al menos 118 especies de importancia económica, alimenticia, cultural o medicinal fueron domesticadas en nuestro país, principalmente de las familias Cactaceae (16 especies de 4 géneros), Fabaceae (14 especies de 9 géneros), Asteraceae (9 especies de 5 géneros) y Agavaceae (7 especies de 2 géneros) (SEMARNAT, 2008). En este ámbito, el uso de las plantas como recurso medicinal en nuestro país, se extiende desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad, calculándose que alrededor de 3 352 especies son plantas medicinales y 5 000 poseen otra utilidad, es decir el 23% de las angiospermas presentes en México (Bye, 1998). La Organización Mundial de la Salud ha determinado que más del 80% de la población mundial que habita

en países en desarrollo depende principalmente de las plantas medicinales para la cura de enfermedades comunes, haciéndose el empleo de dichos remedios cada vez más frecuente en países desarrollados. Alrededor del mundo dos tercios de las 50 mil especies medicinales son silvestres, y de las cuales entre 4 mil y 10 mil se encuentran en alguna categoría de riesgo debido a la disminución constante de las poblaciones naturales como consecuencia de su continua recolección y explotación comercial (Canter *et al.*, 2005). En nuestro país, cerca del 50% de las especies alimenticias y medicinales, y casi la totalidad de los productos vegetales utilizados para la construcción, artesanías y combustible se obtienen de poblaciones naturales (Bye, 1998).

Lo anterior evidencia que el desarrollo de la humanidad se ha basado en el uso de la biodiversidad, obteniendo alimentos, fibras, pieles, productos maderables y medicamentos, así como innumerables servicios ambientales (captación de agua, purificación del aire, etc.) (SEMARNAT, 2008). Así, la biodiversidad y el uso racional de los recursos naturales son elementos indispensables para el desarrollo de un país con base en el bienestar social, a pesar de lo cual, la crisis global que la diversidad biológica enfrenta es creciente (SEMARNAT, 2008) y se debe a diversos factores, desde la destrucción del hábitat por cambio de uso de suelo en respuesta al acelerado crecimiento poblacional, hasta la explotación de sólo unas pocas especies, en donde la ampliación del rango de taxa con un uso potencial, aunado a la búsqueda de nuevas tecnologías permitirían abordar dichos problemas de forma integral.

La biotecnología es un área multidisciplinaria de la ciencia cuyo desarrollo se basa en conocimiento generado por diversas disciplinas como la biología estructural, fisiología vegetal, ecología, microbiología, biología celular, biología molecular, inmunología, bioquímica, genómica, ingeniería de proteínas, etc., que

en conjunto permiten el estudio completo y la manipulación de los sistemas biológicos. Esta área ha tenido gran impacto en las últimas décadas en el sector salud, agrícola, pecuario, medio ambiente, industrial, entre otros, y cuya aplicación es particularmente importante en el desarrollo económico a nivel nacional e internacional de ramos como el farmacéutico, la producción y procesado de alimentos, la industria química y la remediación de ecosistemas (Bolívar-Zapata, 2003).

México posee, por lo tanto, un amplio potencial en su desarrollo futuro que debe de llevarse de la mano con la aplicación de herramientas biotecnológicas y el cuidado y uso sostenible de su biodiversidad, en donde a su vez, se presenta de forma prioritaria el estudio de dicha diversidad biológica desde un punto de vista básico que permita entonces el desarrollo de la ciencia aplicada y así, abordar los retos que nuestro país enfrentará en las siguientes décadas debido al crecimiento poblacional que mantiene, como la demanda de alimentos saludables y nutritivos, medicamentos y servicios de salud modernos, un medio ambiente no contaminado, una industria con procesos limpios y productos competitivos (Bolívar-Zapata, 2003).

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que ha sido ampliamente utilizada para la propagación de diversos taxa, como cícadas, cactáceas, orquídeas, agaves y helechos, cuyos miembros han sido sobreexplotados o sus hábitats han sido alterados o incluso destruidos, por lo que sus poblaciones han sido erradicadas o son vulnerables, de forma que la aplicación del cultivo *in vitro* podría prevenir y/o contrarrestar la sobreexplotación de las poblaciones silvestres, permitiendo aprovechar el potencial regenerativo de distintos tejidos, obtener gran cantidad de individuos a corto y largo plazo, y buscar y producir industrialmente diversos metabolitos secundarios (Roca y

Mroginski, 1991). El CTV es una herramienta que permite el estudio y la generación de conocimiento sobre las especies y así sentar las bases sobre su conservación y aprovechamiento sostenible.

*Dahlia tenuicaulis* y *Dahlia brevis* son dos especies cuyo hábitat ha sido alterado en gran magnitud, estando la primera, bajo amenaza de extinción (NOM-059-ECOL-2001), y la segunda, en un mayor riesgo, ya que sus poblaciones naturales han desaparecido (Bye, com. per.). El CTV nos permitiría conservar a dichas especies, además de mantener una fuente continúa de ejemplares para su estudio y uso sostenible.



## 2. ANTECEDENTES

### El Género Dahlia

La familia Asteraceae es un taxón ampliamente distribuido (Ortiz-Bermúdez *et al.*, 1998) formado por aproximadamente 1300 géneros. El género *Dahlia* pertenece a dicha familia y en México se encuentra la mayor concentración de especies, 31 de las 34 existentes son endémicas de nuestro territorio (Mera y Bye, 2006).

La dalia, conocida antiguamente como "acocoxóchitl", "acocotli", o "cohuanenepilli", es considerada, por decreto presidencial a partir de 1963 (Treviño *et al.*, 2007), la Flor Nacional, ya que, además de ser reconocida por la belleza de sus flores posee también una importancia cultural, pues antiguamente era utilizada de diversas formas como planta ceremonial, ornamental, medicinal y alimenticia (Mera y Bye, 2006). Fue una planta venerada por los aztecas como un símbolo presente sólo en la vestimenta de los nobles. Actualmente, las comunidades mixtecas de Oaxaca y tarahumaras del oeste de nuestro país siguen consumiendo los tubérculos de las dalias como fuente de alimento y medicamentos (Whitley, 1985; Reyes *et al.*, 2004, citado en Mera y Bye, 2006).

La introducción a Europa a finales del siglo XVIII de las dalias permitió que Antonio José Cavanilles y Palop, profesor y director del Jardín Botánico Real de Madrid en esos años, describiera al género *Dahlia* en honor a un importante botánico discípulo de Carlos Linneo, Andreas Dahl., comenzando así su dispersión y diversificación de las variedades cultivadas, evento que horticultores y aficionados europeos han ejercido hasta la actualidad, creando diversas asociaciones que promueven su conservación y fomentan su estudio y cultivo (Mera y Bye, 2006).

## **Clasificación Taxonómica y Descripción del Género *Dahlia***

La siguiente descripción está basada en la monografía original de Sorensen (1969).

### *Dahlia* Cav.

Plantas hermafroditas, anuales o perennes, epífitas, herbáceas o sufrutescentes. Tallos erectos solitarios, 2-4, o muchos formando un racimo, tallos no ramificados excepto en la porción floral o ramificación libre en la base; entrenudos huecos o sólidos; nudos septados o con las divisiones incompletas. Tubérculos fasciculados o raíces tuberosas, en la especie epífita las raíces son aéreas. Hojas simples o compuestas tripinadas, opuestas o verticiladas (3 por nudo); márgenes con o sin cilios pequeños; frecuentemente estipeladas. Flores agregadas en cabezuelas radiadas, esbeltas; pedúnculos desnudos; brácteas del involucreo bi seriadas, las externas erectas, extendidas o reflexas en anthesis, carnosas, con abundantes líneas dorsales, verdes, ligeramente lineares a densamente ovadas u obovadas, las internas membranosas, con líneas, marrones, rojas, café rojizo o café, con los ápices púrpuras o rojos, márgenes escariosos o blancos-hialinos, ovados, subacutados, obtuso, o emarginados, que durante la formación del fruto se alargan al doble de su tamaño; flores liguladas hermafroditas o masculinas, lígulas blancas, lavanda tenue a púrpura profundo o amarillo a varios tonos de anaranjado a escarlata, ligera o ampliamente ovadas, acutadas, minuciosamente denticuladas, venas dorsales minuciosamente pubescentes en algunas ocasiones; flores del disco amarillas, amarillas con ápices rojos o púrpura o con el limbo púrpura, 17-172 por cabezuela, hermafroditas, fértiles, tubulares, corola expandida en 5 dientes, limbo cilíndrico, dientes erectos, extendidos, recurvados o fuertemente revolutos; filamentos glabros; estigma linear lanceolado, recurvado en  $\frac{3}{4}$  de su longitud. Aquenios negro grisáceos a negros en la madurez, más o menos lineares a linear-oblancoados,

obscuramente surcados, algunas veces pubescentes (Sección Entemophyllon).  
Número cromosómico, n= 16, 17, 18 y 32.

Las dalias se presentan en zonas altas (1500-4300 m.s.n.m.) de América Central y México, y su distribución en general es restringida, presentándose formas de vida muy diferentes, desde plantas herbáceas de pocos decímetros de largo, hasta plantas arbustivas o epifitas (Sorensen, 1969). El género *Dahlia* está constituido por 4 secciones y 34 especies (Hansen, 2007). *Dahlia brevis* Sorensen y *Dahlia tenuicaulis* Sorensen pertenecen a las secciones *Dahlia* y *Pseudodendron* respectivamente, y sus descripciones se mencionan a continuación.

### **Clasificación Taxonómica y Descripción de *Dahlia brevis* y *Dahlia tenuicaulis***

Reino Viridiplantae

Subreino Traqueobionta

Superdivisión Spermatophyta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteridae

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Subfamilia Asteroideae

Tribu Heliantheae

Subtribu Coreopsidinae

Género *Dahlia* Cav.

Sección *Dahlia*

Especie *Dahlia brevis* Sorensen

Sección *Pseudodendron*

Especie *Dahlia tenuicaulis* Sorensen

## Sección *Dahlia*

Plantas herbáceas de 0.3-3 m de altura, erectas con entrenudos huecos en su mayoría, nudos septados o ligeramente septados. Raíces tuberosas. Hojas simples a tripinadas opuestas, pínulas opuestas o alternadas en el raquis, peciolo sólido. Inflorescencia en capítulo con flores liguladas y de disco.

### *Dahlia brevis* Sorensen (figura 1)

Planta herbácea de 4–7 dm de altura. Tallos de 2–5 mm de diámetro, muy estriado y pubescente. Hojas simples, pinadas o pinatisectas, de 3.5–14 cm de longitud; 5–7 divisiones o pinas, opuestas, raramente subopuestas o alternadas; la pina basal tiene 12–40 mm de longitud, 4–12 mm de ancho, oblonga-lanceolada, aguda o subaguda casi obtusa; ventralmente glabras o escasamente pubescentes, dorsalmente pubescentes, especialmente a lo largo de la venación central; márgenes ciliados, enteros o irregularmente serrados con 1 ó 2 dientes en cada lado; peciolo de 7–22 mm de longitud, 0.5–4 mm de ancho, usualmente alado en las bases decurrentes de las divisiones laterales; raquis alado, pubescente, especialmente en la unión con las pinas. Inflorescencias en capítulo, de 1–3 por planta, oblicuamente erectas en anthesis, pedúnculos de 10–24 cm de longitud; flores liguladas púrpura claro, extendidas en anthesis, 10–25 mm de longitud, 6–14 mm de ancho, elípticas, agudas o denticuladas; flores de disco amarillas, corola con venación púrpura, lóbulos marginalmente púrpura o completamente púrpura. Aquenios 6–7 mm de longitud, 2–3 mm de ancho.

*Dahlia brevis* se encuentra sobre laderas rocosas, de 2 600 a 3 050 m.s.n.m, en el noroeste del Estado de México (Sorensen, 1969; (figura 3), ubicada sobre la Provincia Terrestre del Eje Neovolcánico (Cuanalo de la Cerda *et al.*, 1989), a pesar de lo cual, recientes y diversas visitas a las localidades de colecta, han mostrado la ausencia completa de ejemplares de dicha especie, indicando que las poblaciones naturales han desaparecido (Bye, com. per.), pues al última colecta fue realizada en septiembre de 1995 por Sorensen (Tropicos, 2008).



**Figura 1.** *Dahlia brevis* Sorensen (tomado y modificado de Art Vogel, 2009).



### **Sección *Pseudodendron***

Plantas sufrutescentes y perennes de 2-9 m de altura. Tallos leñosos que poseen un diámetro de 2-10 cm, entrenudos huecos, nudos fuertemente septados. Raíces tuberosas. Hojas compuestas mono, di o tripinadas, con una longitud de 20-90 cm, ápices de los últimos segmentos atenuados, venación central fuertemente coloreada. Inflorescencia en capítulo.

#### *Dahlia tenuicaulis* Sorensen (figura 2)

Planta leñosa que mide 21-30 dm de altura. Tallos del año previo leñosos y con un diámetro de 1.5-3 cm. Hojas pinadas o bipinadas, 27-43 cm de longitud, 3-7 foliolos, pinas basales de 10-18 cm de longitud y peciolos 2-4 cm de longitud, margen serrado con 8-14 dientes en cada lado. Inflorescencia en

capítulos 12 ó más en cada rama principal; corola reflexa en antesis, 8–12 mm de longitud, 2–4 mm de grosor; flores liguladas púrpuras, 2.8–4 cm de longitud, 1–2 cm de ancho; 70–80 flores de disco. Aquenios linear-lanceolados, 11-15 mm de longitud, 1–2 mm de ancho.

Esta especie habita en bosques densos y no perturbados de *Pinus*, *Abies* y *Arbutus*, ubicados sobre las Provincias Terrestres Subserranence y Sierra Madre del Sur (Cuanalo de la Cerda *et al.*, 1989) (figura 3); en suelos profundos y crece a una altitud de 2,600 a 3,000 m.s.n.m. Florece de agosto a octubre (Sorensen, 1969). Esta planta es endémica de México y se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-ECOL-2001), situación que es aun más crítica, pues se ha reportado que *D. tenuicaulis* no forma semillas (Mejía-Muñoz *et al.*, 2007).



**Figura 2.** *Dahlia tenuicaulis* Sorensen (tomado y modificado de Strange Wonderful Things, 2010)



**Figura 3.** Mapa de distribución de *Dahlia brevis* y *D. tenuicaulis* (basado en localidades de colecta de Sorensen, 1938-1999).

## Propiedades Alimenticias y Medicinales del Género *Dahlia*

Las dalias han sido utilizadas como plantas alimenticias y medicinales, en diversas compilaciones de los usos tradicionales de las plantas nativas de nuestro país, se ha reportado su empleo como un remedio contra la tos crónica, diurético, diaforético, mitigante de cólicos, contra el enfriamiento, agotamiento, fiebre e inclusive, se menciona su capacidad de disolver tumores mediante su aplicación directa (Hernández, 1946, citado en Whitley, 1985). También se reportó su uso en combinación con otras especies, ya que una mezcla de los tubérculos de las dalias y la raíz del nopal era aplicada en caso de sufrir fracturas; así mismo se utilizaba una infusión amarga a partir del tallo macerado de las dalias y semillas de chíca como alivio cuando se presentaba una obstrucción del meato urinario (Whitley, 1985).

Estas propiedades medicinales de las dalias hacen referencia principalmente a *Dahlia coccinea* y *Dahlia pinnata*, sin embargo las determinaciones de las especies se han basado en las ilustraciones encontradas en compilaciones de los usos tradicionales de estas plantas, como el "Códice Badiano" de Juan Badiano y "La Historia de las Plantas de la Nueva España (*Thesaurus*)" de Francisco Hernández (Sorensen, 1970), en las cuales, en muchos de los casos, la caracterización de las plantas se ha mantenido a nivel de género. Pese a esto, Sorensen (1970) menciona que de acuerdo a las características foliares, algunas ilustraciones podrían pertenecer a *D. brevis*.

En un intento por conocer la alimentación de algunas comunidades indígenas de Guatemala, Booth y colaboradores (1992) evaluaron el contenido nutrimental de *Dahlia imperialis*, cuyas hojas son cocinadas en conjunto con tomate y cebolla, siendo un platillo de alto consumo en la región de Alta Verapaz. El estudio demostró que éstas poseen carotenos, ácidos grasos y fibras (3 mg, 1 y 1.6 g por 100 g de peso fresco respectivamente), siendo mucho más abundante la



presencia de proteínas y carbohidratos (4.9 y 3.6 g por 100 g de peso fresco respectivamente), además de ser una rica fuente de calcio, fosfato, fierro, sodio y magnesio. Dicho tratado es de particular importancia, pues reconoce el interés creciente hacia las fuentes de alimento tradicionales en un intento por explotar el potencial que éstas tienen y promover su consumo en los países en desarrollo, recurriendo así al uso de diversas especies y evitar la concentración de la alimentación en sólo unas cuantas.

Algunos de los compuestos que se han identificado, así como sus propiedades, se mencionan a continuación (Whitley, 1985):

1. ácido benzoico ( $C_6H_5COOH$ ): conservador de alimentos, queratolítico tópico fungicida y bactericida, enjuague bucal antiséptico, diurético y expectorante, en altas concentraciones incrementa la eliminación de ácido úrico.
2. eriodictiol (3',4',5,7-tetrahidroxi flavanona, aglucona de la eriodictina): expectorante, astringente, tratamiento del asma.
3. diastasa (mezcla de enzimas amilolíticas): convierte el almidón en azúcar, es usado en desórdenes gastrointestinales.
4. fitina (sal del ácido fítico con calcio, fósforo y magnesio): suplemento alimenticio en enfermedades crónicas, anemia, tuberculosis, raquitismo.
5. inulina en los tubérculos, la cual es convertida en el cuerpo a D- fructosa, siendo más tolerable con respecto a otros carbohidratos por las personas enfermas de diabetes (Wagner, 1977), pudiéndose preparar diversos productos alimenticios como postres, aderezos, rellenos y productos lácteos, además de adicionarse como fibra y promover el desarrollo de la microflora intestinal (Niness, 1999).

Algunos estudios han evaluado la actividad biológica de los compuestos aislados, justificando algunos de los usos dados antiguamente a dichas plantas.

Wat y colaboradores (1981) evaluaron diversos poliacetilenos presentes en los miembros de la familia Asteraceae, algunos de ellos aislados a partir de *D. coccinea*, estos compuestos poseen actividad insecticida contra larvas de *Aedes aegypti* y *Simulium vittatum*, e individuos adultos de *Chaenorhabditis elegans* (nemátodo), así como contra hongos fitopatógenos, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (McLachlan *et al.*, 1986). Así mismo, los poliacetilenos aislados a partir de un híbrido de *Dahlia* sp., cuyo origen no es claro, se evaluaron, indicando que éstos tienen una actividad fagoinhibitoria en las larvas de *Mythimna unipuncta* (gusano soldado del maíz), *Spodoptera littoralis* (rosquilla negra) y *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa) (Muckensturm *et al.*, 1986).

La gran mayoría de los eucariontes superiores producen péptidos antimicrobianos ricos en cisteína, denominados defensinas, que previenen el crecimiento de microorganismos y la infección de sus tejidos (Thevissen *et al.*, 2000a). En las semillas de *D. merckii* se han identificado dos de estas defensinas: Dm-AMP1 y Dm-AMP2, que inhiben el crecimiento y promueven la distorsión morfológica de los hongos *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium culmorum*, *Leptosphaeria maculans*, *Neurospora crassa*, *Penicillium digitatum*, *Septoria tritiei* y *Verticillium albo-atrum*, algunas líneas de *Saccharomyces cerevisiae* y de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* (Osborn *et al.*, 1995; Thevissen *et al.*, 2000a), formando zonas porosas en la membrana plasmática que modifican la permeabilidad de iones y solutos que producen una inestabilidad osmótica y un cambio instantáneo del potencial de membrana (Tavares *et al.*, 2008; Thevissen *et al.*, 2000b). Al aumentar la temperatura, la actividad antimicrobiana de dichos péptidos disminuye (Osborn *et al.*, 1995).

Mediante la transformación de plantas de *Solanum melongena* (berenjena) que expresaban al péptido Dm-AMP1, se redujo el desarrollo del hongo *Botrytis cinerea* en el follaje en un rango del 36 al 100 % , y el crecimiento de *Verticillium*

*albo-atrum* en las raíces sin afectar las respuestas de reconocimiento y el establecimiento de la simbiosis con el hongo micorrízico-arbuscular *Glomus mosseae* (Turrini *et al.*, 2004). La misma técnica fue utilizada en cultivos transformados de *Carica papaya* (papaya), que al ser transformada y expresar la defensina Dm-AMP1, inhibió el crecimiento de *Phytophthora palmivora* en cultivos *in vitro* e incrementó drásticamente la resistencia al hongo en plantas de invernadero mediante la inhibición del crecimiento de las hifas (Zhu *et al.*, 2007).

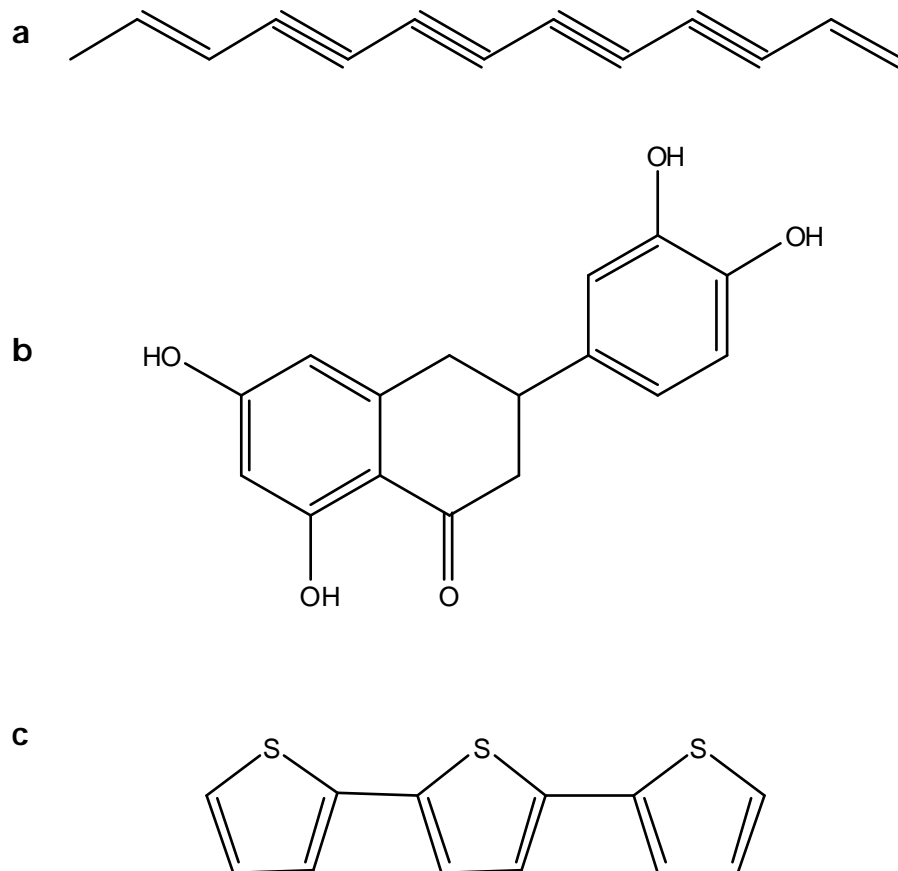
Los trabajos anteriores indican el potencial que poseen las dalias debido a sus propiedades nutricionales así como organismos productores de diversos metabolitos, cuyo conocimiento permitiría la generación de nuevas estrategias para el descubrimiento de productos biotecnológicos importantes como inhibidores de la actividad de fitopatógenos en la agricultura, conservadores en la industria alimentaria y bioinsecticidas (Tavares *et al.*, 2008). Actualmente se ha patentado un producto basado, entre otros componentes, en las dalias, el cual se describe a continuación:

Ichimaru Pharcos Inc. (Mitsuharu, 2001) de Japón, patentó diversos cosméticos, preparaciones para baño, y detergentes con efectos rehidratantes y suavizantes para la piel con extractos de *Trifolium pratense*, *Gerbera jamesonii*, *Zantedeschia aethiopica*, *Platycodon grandiflorum*, *Cosmos bipinnatus*, *Dahlia pinnata*, *Tulipa gesneriana*, *Bellis perennis*, *Eustoma grandiflorum*, *Dahlia coccinea*, *Helianthus annuus*, *Chrysanthemum frutescens*, *Alstroemeria pulchella*, *Alstroemeria aurantiaca*, *Pharbitis nil*, *Hydrangea macrophylla* var. otaksa, *Brassica campestris*, *Dianthus caryophyllus*, *Hydrangea macrophylla*, *Trifolium repens*, *Prunus yedoensis*, *Sophora japonica*, *Chrysanthemum boreale*, *Magnolia liliflora*, *Viola odorata*, *Borago officinalis*, *Verbascum thapsus*, *Verbascum thapsiforme* y *Rosa* sp.

## Fitoquímica del Género *Dahlia*

El estudio fitoquímico de las dalias se ha enfocado principalmente en establecer el contenido de tipos de metabolitos secundarios: los poliacetilenos (tabla 1) y flavonoides (tabla 2). Los poliacetilenos son compuestos con triples ligaduras que se encuentran ampliamente distribuidos en la familia Asteraceae y en el género *Dahlia* (figura 4a); al parecer sólo dos especies, *Dahlia lehmanni* y *Dahlia imperialis* carecen de ellos, puesto que en los diversos estudios realizados no se han aislado (Lam *et al.*, 1968). Por otro lado, el inicio del estudio de los flavonoides, compuestos polifenólicos (figura 4b), se debió al interés creciente en los colores de las flores durante la primera mitad del siglo XX. Posteriormente se realizaron diversos estudios con la finalidad de establecer el origen de las variedades cultivadas, así como de producir perfiles que permitieran hacer una delimitación quimiotaxonómica y diferenciación entre secciones con mayor fundamento (Giannasi, 1975a y 1975b).

En las dalias, además de poliacetilenos y flavonoides, se han aislado tiofenos, compuestos heterocíclicos sulfurados (figura 4c), que hasta la fecha, sólo se han encontrado en *Dahlia tubulata*, por lo cual, además de tener una función alelopática debida a su interacción con herbívoros, pueden tener importancia quimiotaxonómica (Christensen *et al.*, 1990) (tabla 3). Otros compuestos encontrados en el género han sido identificados como cumarinas, alilbencenos y xantonas (tabla 3).



**Figura 4.** Estructuras químicas representativas de los metabolitos secundarios presentes en las dalias. **a)** Poliacetileno (trideca-1,11-dieno-3,5,7,9-tetraíno), **b)** flavonoide (eriodictiol), y **c)** tiofeno (2,2',5',2''-tertiofeno).

**Tabla 1.** Poliacetilenos aislados en *Dahlia* spp. \*, +

Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan
1-fenil-hepta-1,3,5-triino	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	63	Raíces y tubérculos
	<i>D. pinnata</i> <sup>2,4</sup>	24	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
1-fenil-hepta-5-en-1,3-diino	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3,5</sup>	0.6-900	Toda la planta
	<i>D. pinnata</i> <sup>3,4</sup>	244	Partes aéreas, raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	138-2785	Flores, hojas y raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	130	Raíces
1-acetoxi-7-fenil-hepta-2,4,6-triino	<i>D. pinnata</i> <sup>3,4</sup>	...	Tubérculos
1-acetoxi-7-fenil-hepta-2-en -4,6-diino	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	74	Raíces y tubérculos
		48	Partes aéreas
	<i>D. pinnata</i> <sup>3,4</sup>	100	Tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	4	Raíces
7-fenil-hepta-2-en -4,6-diin -1-ol	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	42	Raíces y tubérculos
		21	Partes aéreas
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	43	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	6	Raíces
<b>7-fenil-hepta-2-en-4,6-diin-1-al</b>	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	28	Raíces y tubérculos
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	8	Tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>2</sup>	-	<b>Raíces</b>
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces

Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan	
2,6-dimetil-octa-1,3,5,7-tetraeno (cosmeno)	<i>D. sherffii</i> <sup>5,7</sup>	1-16	Flores, hojas y raíces	
tetrahidro-2-(nona-1,7-dien-3,5-dinil)piran-3-ol	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	31	Raíces y tubérculos	
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces	
	<i>D. coccinea</i> <sup>5</sup>	3.7	Hojas	
3-acetoxi-tetrahidro-2-(nona-1-en-3,5,7-trinil)pirano	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	120	Flores y partes aéreas	
tetrahidro-2-(nona-1-en-3,5,7-trinil)piran-3-ol	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3,5</sup>	5.2-60	Flores y partes aéreas	
deca-2,8-dien-4,6-dín-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	3-9	Raíces	
trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	...	Tubérculos y hojas	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas	
	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	2-8	Raíces y tubérculos	
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	0.6-1	Tubérculos, hojas y flores	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1-8.4	Flores, hojas y raíces	
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas y raíces	
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces	
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	1-9	Raíces	
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	0.1- 2.5	Raíces y tubérculos	
		...	Flores y partes aéreas	
	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	1.6-5	Flores, partes aéreas y raíces	
	<b>trideca-2,12-dien-4,6,8,10-tetraín-1-ol</b>	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	0-1.3	Flores, raíces y tubérculos
		<b><i>D. tenuicaulis</i><sup>10</sup></b>	-	<b>Raíces y tubérculos</b>
<i>D. imperialis</i> <sup>10</sup>		<0.5	Raíces y tubérculos	
<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>		-	Flores, partes aéreas y raíces	
<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>		4.7	Partes aéreas	
<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>		1-30.6	Flores, Hojas y raíces	
<i>D. australis</i> <sup>5</sup>		4	Raíces	
	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	1-2	Raíces	

<b>Poliacetileno</b>	<b>Especies que lo contienen</b>	<b>Cantidad (mg/Kg)</b>	<b>Estructuras que lo presentan</b>
<b>trideca-2,12-dien-4,6,8,10-tetraín-1-al</b>	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>2,3,10</sup>	-	<b>Raíces y tubérculos</b>
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	...	Raíces y tubérculos
	<i>D. imperialis</i> <sup>2,10</sup>	10	Raíces y tubérculos
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	3.2	Partes aéreas
	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	8-10.5	Flores y hojas
<b>1-acetoxi-trideca-2,12-dien-4,6,8,10-tetraíno</b>	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>2,3,10</sup>	-	<b>Raíces y tubérculos</b>
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	...	Raíces y tubérculos
	<i>D. imperialis</i> <sup>10</sup>	5	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1-10.5	Flores, hojas y raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas y raíces
	<i>D. coccinea</i> <sup>3</sup>	-	Flores, partes aéreas y raíces
trideca-4,6-dien-8,10,12-triíen-1-ol	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	31.5	Partes aéreas
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas
1-acetoxi-trideca-4,6-dien-8,10,12-triíno	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas
	<i>D. coccinea</i> <sup>2,3</sup>	-	Flores y partes aéreas
1,3-diacetoxi-tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	10-50	Toda la planta
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	27	Tubérculos, hojas y flores
trideca-1,3-dien-5,7,9,11-tetraíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	-	Raíces y tubérculos
	<i>D. pinnata</i> <sup>2,4</sup>	0.5-4	Tubérculos, hojas y flores
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
trideca-3,5,11-trien-7,9-diín-1-ol	<i>D. scapigera</i> <sup>6,8</sup>	132-275	Raíces y tubérculos
trideca-1,3,5-trien-,7,9,11-triíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	...	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Flores
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Flores, partes aéreas y raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	3-39	Flores y hojas



Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan	
trideca-1,5,11-trien-7,9-diino	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	4-4.7	Flores y Hojas	
trideca-1,3,11-trien-5,7,9-triino	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	0.03-17	Raíces y tubérculos	
	<i>D. pinnata</i> <sup>2,3,4</sup>	2-3	Tubérculos, hojas y flores	
	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	...	Tubérculos y Raíces	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1-2.2	Flores, partes aéreas y raíces	
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces	
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces	
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	2-18	Raíces	
trideca-1,5,11-trien-7,9-diin-3,4-diol	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	1	Raíces	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y raíces	
3,4-diacetoxi-trideca-1,5,11-trien-7,9-diino	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	8	Tubérculos	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	21	Raíces	
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	1	Raíces	
1-acetoxi-trideca-3,5,11-trien-7,9-diino	<i>D. scapigera</i> <sup>6,8</sup>	310-570	Raíces y tubérculos	
<b>trideca-2,10,12-trien-4,6,8-triin-1-ol</b>	<b><i>D. tenuicaulis</i><sup>10</sup></b>	-	<b>Raíces y tubérculos</b>	
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	3.8-8	Raíces y tubérculos	
	<i>D. imperialis</i> <sup>2,10</sup>	<0.5	Raíces y tubérculos	
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1.4-17.3	Flores, partes aéreas y raíces	
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces	
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	11-15	Raíces	
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas y raíces	
	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	11.5	Raíces	
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	<1	Raíces	
	<b>trideca-2,10,12-trien-4,6,8-triin-1-al</b>	<b><i>D. tenuicaulis</i><sup>2,3,10</sup></b>	<b>11</b>	<b>Raíces y tubérculos</b>
		<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	1.5-8	Raíces y tubérculos
		<i>D. imperialis</i> <sup>10</sup>	50	Raíces y tubérculos
		<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	2.6	Raíces
<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>		<1	Raíces	

Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan
1-acetoxi-trideca-2,10,12-trien-4,6,8-triino	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>2,3,10</sup>	8	Raíces y tubérculos
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	0.6-24	Raíces y tubérculos
	<i>D. imperialis</i> <sup>10</sup>	20	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1.4-2.2	Flores y raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. imperialis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	5.8	Raíces
13-hidroxi-trideca-2,8,10-trien-4,6-diín-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	14-18	Raíces
trideca-2,10,12-trien-4,6,8-triín-1-ol	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>10</sup>	-	Raíces y tubérculos
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	3.8-8	Raíces y tubérculos
	<i>D. imperialis</i> <sup>2,10</sup>	<0.5	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1.4-17.3	Flores, partes aéreas y raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	11-15	Raíces
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas y raíces
	<i>D. tubulata</i> <sup>9</sup>	11.5	Raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	<1	Raíces
	trideca-4,6,12-trien-8,10-diín-1,3-diol	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-
<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>		-	Raíces
<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>		-	Raíces
1,3-diacetoxi-trideca-4,6,12-trien-8,10-diíno	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
trideca-1,3,5,11-tetraen-7,9-diíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3,5</sup>	0.06-0.6	Raíces y tubérculos
	<i>D. pinnata</i> <sup>2,4</sup>	1.2	Flores y tubérculos
	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	2-8	Tubérculos y Raíces
	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	1.4-43	Flores, partes aéreas y raíces
	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-18	Raíces
trideca-2,8,10,12-tetraen-4,6-diín-1-ol	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	2.9	Raíces
1-acetoxi-trideca-2,8,10,12-tetraen-4,6-diíno	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	5.4	Raíces

Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan
1-acetoxi-trideca-3,5,9,11-tetraen-7-ino	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	6	Raíces
<b>tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triín-1-ol</b>	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>11</sup>	-	<b>Hojas y flores</b>
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	0.7-1.3	Partes aéreas y raíces
tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triín-1,3-diol	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	4-215	Toda la planta
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	...	Hojas y flores
1-acetoxi-tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3,5</sup>	0.6-5	Partes aéreas y raíces
3-acetoxi-tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	-	Partes aéreas
<b>1,3-diacetoxi-tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triíno</b>	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>11</sup>	-	<b>Hojas y flores</b>
1-acetoxi-tetradeca-8,10-diín-4,6,12-triín-3-ol	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	-	Tubérculos
3-acetoxi-tetradeca-8,10-diín-4,6,12-triín-1-ol	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	-	Tubérculos
1-acetoxi-4,5-epoxi-tetradeca- 6,12-dien- 8,10-diíno	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	...	Raíces y tubérculos
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	...	Raíces
tetradeca-4,6,12-trien-8,10-diín-1-ol	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	2-140	Flores, hojas y raíces
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	2-400	Hojas y raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	2	Raíces
	<i>D. coccinea</i> <sup>5</sup>	3.2	Raíces
tetradeca-4,6,12-trien-8,10-diín-1,3-diol	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	53	Tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	4.3	Raíces
tetradeca-4,6,12-trien-8,10-diín-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-108	Hojas y raíces
1-acetoxi-tetradeca-4,6,12-trien-8,10-diíno	<i>D. sherffii</i> <sup>2,5</sup>	412	Raíces
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	<1	Raíces
	<i>D. coccinea</i> <sup>5</sup>	1.3	Raíces
	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-8	Hojas y raíces
1,3-diacetoxi-tetradeca-4,6,12-trien-8,10-diíno	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	71	Tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	1-54	Flores, hojas y raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	6	Raíces
tetradeca-4,6,10,12-tetraen-8-ín-1-ol	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	5-15	Hojas y raíces

<b>Poliacetileno</b>	<b>Especies que lo contienen</b>	<b>Cantidad (mg/Kg)</b>	<b>Estructuras que lo presentan</b>
tetradeca-4,6,10,12-tetraen-8-ín-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	1-11	Hojas y raíces
1-acetoxi-tetradeca-4,6,10,12-tetraen-8-ino	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	6	Raíces
1-hidroxi-tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triín-3-ona	<i>D. coccinea</i> <sup>1,3</sup>	-	Partes aéreas
hexadeca-7,14-dien-10,12-diín-1-ol	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Flores, partes aéreas y raíces
1-acetoxi-hexadeca-7,14-dien-10,12-diíno	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas
hexadeca-6,8,14-trien-10,12-diín -1-ol	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-400	Hojas y raíces
hexadeca-6,8,14-trien-10,12-diín -1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-108	Hojas y raíces
1-acetoxi-hexadeca-6,8,14-trien-10,12-diíno	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-8	Hojas y raíces
1-acetoxi-hexadeca-7,12,14-trieno-10-ino	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2</sup>	-	Flores y partes aéreas
16-hidroxi-hexadeca-2,8,10-trien-4,6-diín-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	14-18	Raíces
hexadeca-6,8,12,14-tetraen-10-in -1-ol	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	4-9	Tubérculos y Raíces
		-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	2-15	Flores, partes aéreas y raíces
hexadeca-6,8,12,14-tetraen-10-in-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	1-11	Hojas y raíces
1-acetoxi-hexadeca-6,8,12,14-tetraen-10-ino	<i>D. scapigera</i> <sup>6</sup>	14-32	Tubérculos y Raíces
		-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>2,7</sup>	6	Flores, partes aéreas y raíces
heptadeca-1,8,15-trien-11,13-diíno	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	<1	Raíces
heptadeca-1,7,9-trien-11,13,15-triíno	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2,3</sup>	...	Partes aéreas
	<i>D. pinnata</i> <sup>4</sup>	10-13	Hojas y flores

Poliacetileno	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan
heptadeca-1,7,9,15-tetraen-11,13-diino	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>2,10</sup>	40-50	Raíces y tubérculos
	<i>D. sherffii</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas y raíces
	<i>D. rudis</i> <sup>2</sup>	25	Raíces
	<i>D. pinnata</i> <sup>2</sup>	-	Partes aéreas
	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	2-7	Raíces
	<i>D. australis</i> <sup>5</sup>	2	Raíces
heptadeca-1,7,9,13,15-pentaen-11-ino	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	1.9	Raíces
octadeca-9,12-dien-1-al	<i>D. merckii</i> <sup>7</sup>	10-27	Raíces

\* la nomenclatura corresponde a la utilizada en la literatura que se consultó

+ en negritas se muestran los poliacetilenos que se encuentran en las especies de interés

- indica que el dato no está disponible

... indica que las cantidades son mínimas y difíciles de establecer

(Lam *et al.*, 1968<sup>1</sup>; Lam, 1973<sup>2</sup>; Lam, 1998<sup>3</sup>; Bendixen *et al.*, 1969<sup>4</sup>; Lam *et al.*, 1991<sup>5</sup>; Lam y Kaufmann, 1971<sup>6</sup>; Neuschild *et al.*, 1992<sup>7</sup>; Kaufman y Lam, 1965<sup>8</sup>; Christensen *et al.*, 1990<sup>9</sup>; Lam, 1971<sup>10</sup>; Lam y Wrang, 1975<sup>11</sup>)

**Tabla 2.** Flavonoides aislados en *Dahlia* spp. \*, +

Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan
4,2',4'-trihidroxi chalcona (isoliquiritigenina)	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>1,2,3</sup>	Flores
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-
	2',4',3,4-tetrahidroxi chalcona (buteína) y 6,3',4'-trihidroxi aurona (sulfuretina)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>
<i>D. tenuicaulis</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>		Flores y hojas
<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>		Flores
<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>		Hojas
<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>		Hojas
<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>		Hojas
<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>		-
<i>D. brevis</i> <sup>1,2</sup>	-	

Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan	
2',4',3,4-tetrahidroxi chalcona (buteína) y 6,3',4'-trihidroxi aurona (sulfuretina) (continuación)	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	Flores y hojas	
	<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>	-	
	<i>D. apiculata</i> <sup>1,2</sup>	-	
	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	Hojas	
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
	<i>D. rupicola</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-	
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-	
2',4',4-trihidroxi-3-metoxi chalcona	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	-	
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	Hojas	
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	Hojas	
	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	-	
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
	<i>D. rupicola</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
	<b>2',4',3,4'-tetrahidroxi-4-metoxi chalcona</b>	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>		-	
<b><i>D. brevis</i></b> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>		-	
<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>		-	
<b>2'-hidroxi-4,4',6'-trimetoxi chalcona</b>		<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2,3</sup>	<b>Hojas</b>
<b>3,2',4'-trihidroxi-4-metoxi chalcona</b>		<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>3</sup>	<b>Flores</b>

Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan
7,5,4'-trihidroxi flavona (apigenina)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Flores y hojas
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. brevis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5-dihidroxi-4'-metoxi flavona (acacetina)	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores
7,5,4'-trihidroxi-6'-metoxi flavona	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5,4'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi flavona	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-



Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan
7,5,3',4'-tetrahidroxi flavona (luteolina)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. brevis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5,3'-trihidroxi-4'-metoxi flavona (diosmetina)	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxi flavona	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi flavona	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores
6-metoxi flavona	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	Flores

Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan
7,5,3,4'-tetrahidroxi flavona (camperol)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. apiculata</i> <sup>1,2</sup>	-
7,5,3,3',4'-pentahidroxi flavona (quercetina)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. coccinea</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	Hojas
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. brevis</i></b> <sup>1,2</sup>	<b>Hojas</b>
	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	-
<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>	Hojas	
<i>D. apiculata</i> <sup>1,2</sup>	-	
5,7,4'-trihidroxi-flavanona	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>4</sup>	<b>Partes aéreas</b>

Flavonoide	Especies que lo contienen	Estructuras que lo presentan
5,7,4'-trimetoxi flavanona	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>3</sup>	Hojas
5-hidroxi-7,4'-dimetoxi flavanona	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>3</sup>	Flores y hojas
5,7,4'-trimetoxi flavan-4-ol	<i>D. tenuicaulis</i> <sup>3</sup>	Hojas
7,5,3,3',4'-pentahidroxi flavilio (cianidina)	<i>D. imperialis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. tenuicaulis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. australis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. sherffii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. pinnata</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. atropurpurea</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. coccínea</i> <sup>1,2</sup>	Flores
	<i>D. scapigera</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. merckii</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. barkerae</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. mollis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. tenuis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<b><i>D. brevis</i></b> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rudis</i> <sup>1,2</sup>	-
<i>D. cardiophylla</i> <sup>1,2</sup>	Flores	
7,5,3,3',4'-pentahidroxi flavilio (cianidina)	<i>D. foeniculifolia</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. linearis</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. rupicula</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. dissecta</i> <sup>1,2</sup>	-
	<i>D. scapigeroides</i> <sup>1,2</sup>	-

\* la nomenclatura corresponde a la utilizada en la literatura que se consultó

+ en negritas se muestran los flavonoides que se encuentran en las especies de interés

- indica que el dato no está disponible

(Giannasi, 1975a<sup>1</sup> y 1975b<sup>2</sup>; Lam y Wrang, 1975<sup>3</sup>; y Kaufmann y Lam, 1967<sup>4</sup>)

**Tabla 3.** Otros metabolitos identificados en *Dahlia* spp.\*

Compuesto	Especies que lo contienen	Cantidad (mg/Kg)	Estructuras que lo presentan
8-hidroxi-6,7-dimetoxi-cumarina (fraxidina)	<i>D. barkeriae</i> <sup>1</sup>	140	Tubérculos
2-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-xanton-9-ona (mangiferina)	<i>D. australis</i> <sup>2,3</sup>	-	Hojas
5-etenil-5'-([E]prop-1-enil)-2,2'-bis-tiofeno	<i>D. tubulata</i> <sup>4</sup>	31	Flores y partes aéreas
2-(3-but-1-inil)-5-([E]3-penten-1-inil)-tiofeno	<i>D. tubulata</i> <sup>4</sup>	<1.5	Flores, partes aéreas y raíces
2-(3-but-1-inil)-5-(1,3-pentadin-1-il)-tiofeno	<i>D. tubulata</i> <sup>4</sup>	...	Flores, partes aéreas y raíces
5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bis-tiofeno	<i>D. tubulata</i> <sup>4</sup>	...	Flores, partes aéreas y raíces
2,2',5',2''-tertiofeno	<i>D. tubulata</i> <sup>4</sup>	...	Flores, partes aéreas y raíces
4-alil-2-metoxifenol	<i>D. sherffii</i> <sup>5</sup>	15.5	Hojas

\* la nomenclatura corresponde a la utilizada en la literatura que se consultó

- indica que el dato no está disponible

... indica que las cantidades son mínimas y difíciles de establecer

(Kaufmann y Lam, 1967<sup>1</sup>; Giannasi, 1975a<sup>2</sup> y 1975b<sup>3</sup>; Christensen *et al.*, 1990<sup>4</sup>; y Lam *et al.*, 1991<sup>5</sup>)

Así, el estudio fitoquímico del género *Dahlia* se ha desarrollado abundantemente. Sin embargo, la actividad fisiológica de los metabolitos en la planta, y su uso potencial, es inconclusa. Por este motivo se propone el Cultivo de Tejidos Vegetales como una estrategia que permitiría ampliar este conocimiento y prevenir la explotación de las poblaciones de estas especies.

## Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta multidisciplinaria que estudia el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre, en un medio artificial (George *et al.*, 2008), y cuyo desarrollo está históricamente ligado al descubrimiento de la célula y la generación de la Teoría Celular, la cual, mediante sus postulados, estableció que cada célula es autónoma, base del concepto de totipotencialidad que entonces, permitió al botánico Gottlieb Haberlandt desarrollar finalmente el significado de cultivo *in vitro* en 1902 (Razdan, 2003).

Los objetivos del CTV son muy variados, sin embargo, se han podido establecer las siguientes líneas de trabajo como las principales (Smith, 2000):

- Propagación de plantas o micropropagación, con la finalidad de rescatar especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo, generación de plantas libres de patógenos y creación de bancos de germoplasma.
- Obtención de una gran cantidad de individuos iguales a la planta madre, o clones, con el propósito de mantener una característica deseada con potencial ornamental, alimenticio, entre otros.
- Estudio del metabolismo primario y secundario de las plantas; morfogénesis (xilogénesis p.e.) y citodiferenciación, organogénesis y producción de embriones somáticos; interacción planta-microbio en procesos como generación de tumores, bioquímica de la multiplicación viral, actividad de fitotoxinas y resistencia a enfermedades.
- Producción de plantas modificadas, eliminando los eventos de incompatibilidad sexual e inviabilidad y dormancia de semillas. La creación de plantas transformadas ha tomado gran relevancia debido a la producción de plantas con diferencias bioquímicas que permiten obtener líneas que pueden ser resistentes a enfermedades, insectos, malezas, estrés hídrico,

salino, contra herbicidas y antibióticos, mostrando un alto potencial en la agricultura y horticultura.

- Aumentar la producción de metabolitos secundarios en relación a la planta madre la generación de compuestos mediante la transformación de células con potencial en la industria farmacéutica y alimenticia.

El alcance de las metas anteriores depende en gran parte de los siguientes factores: del explante y de las condiciones de cultivo (medio de cultivo, fotoperiodo y temperatura).

### **Explante**

El CTV comienza con el aislamiento de órganos o segmentos de las plantas, llamados explantes, o bien, a partir de las plantas completas, semillas o plántulas, cuya elección depende del tipo de cultivo que se iniciará, el objetivo del cultivo y de la especie. El tamaño de dicho explante es importante, usualmente los explantes de mayor tamaño aumentan la probabilidad de tener un cultivo exitoso. Así mismo, es necesario tomar en cuenta la salud y edad de la planta madre, como las variaciones fisiológicas y morfológicas que ésta puede tener de acuerdo a la estacionalidad (George *et al.*, 2008).

### **Medio de Cultivo**

El medio usualmente consiste de una solución de sales (macro y micronutrientes, una fuente de carbono, suplementos orgánicos, reguladores de crecimiento y agentes gelificantes, como agar o Phytigel siendo la composición específica para cada especie, e inclusive para cada tipo de explante (George *et al.*, 2008).

Una variedad de elementos inorgánicos que se encuentran naturalmente en el suelo, deben de proporcionarse a las plantas. Éstos son nitrógeno, potasio, calcio, fósforo magnesio y azufre en grandes cantidades, y fierro, níquel, cloro,

manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno en menor proporción; todos ellos necesarios junto con el carbono, oxígeno e hidrógeno que deben complementarse con cobalto, aluminio, sodio y yodo (George *et al.*, 2008).

La fuente de energía proporcionada en el medio es usualmente la sacarosa, que durante el proceso de esterilización en autoclave es convertida en glucosa y fructosa, siendo la primera la que representa casi en su totalidad la fuente de carbono primaria, mientras que la segunda es utilizada únicamente cuando la glucosa se ha consumido completamente. Otras fuentes de carbono con menor éxito son la lactosa, galactosa y maltosa (Razdan, 2003).

Los suplementos orgánicos se refieren a las vitaminas, aminoácidos, entre otros. Las vitaminas son sintetizadas por la planta, sin embargo, en el cultivo *in vitro* éstas se generan en muy baja cantidad, por lo cual suelen adicionarse para mejorar el rendimiento de los cultivos. Algunas vitaminas utilizadas con frecuencia son: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y mioinositol (Razdan, 2003).

Aunque los cultivos *in vitro* son capaces de generar los aminoácidos necesarios, suelen agregarse con la finalidad de estimular el crecimiento en cultivos de protoplastos, siendo los más utilizados la caseína hidrolizada, L-glutamina, L-asparagina, L-glicina, L-arginina y L-cisteína (Razdan, 2003).

Otros suplementos orgánicos corresponden a extractos orgánicos cuyos componentes son de naturaleza indefinida, que incluyen al agua de coco, extracto de levadura y malta, plátano, papa, jugo de naranja y tomate. Aunque dichos suplementos han demostrado ser efectivos, no es recomendable su uso, ya que los componentes de todos ellos varían grandemente, haciéndose poco repetibles los resultados obtenidos (Razdan, 2003).

El carbón activado es otro componente cuyos efectos en los cultivos pueden ser estimulantes o inhibitorios dependiendo de la especie a estudiar, procesos que se deben a su capacidad de adsorber fitohormonas, nutrientes y compuestos tóxicos. Esta última capacidad, permite su aplicación como agente antioxidante, ya que las plantas, particularmente las especies tropicales, poseen compuestos fenólicos que se oxidan cuando las células son dañadas o senescentes, efecto que puede ser disminuido también con la adición de carbón activado, ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinil-pirrolidona, entre otros (Razdan, 2003).

El medio de cultivo a su vez, puede ser sólido o líquido, en donde al primero, debe adicionarse un agente gelificante inerte (George *et al.*, 2008).

Los reguladores de crecimiento son compuestos que en muy bajas concentraciones son capaces de modificar el crecimiento y la morfogénesis de las plantas y por lo tanto, de su presencia o ausencia dependerá grandemente el resultado del cultivo, necesitándose diferentes fitohormonas y en diferentes cantidades en cada etapa de la micropropagación (Razdan, 2003).

### **Métodos de Propagación**

El cultivo *in vitro* puede realizarse con órganos diferenciados o células desorganizadas. En el cultivo de órganos pueden utilizarse órganos determinados, es decir, aquellos que poseen un tamaño y forma establecidos, como las hojas, flores y frutos; o bien, órganos indeterminados en donde el crecimiento es potencialmente ilimitado, como los meristemos (yemas laterales y meristemos apicales) de tallos, raíces y embriones. El cultivo de células se realiza con base en los callos, tejido amorfo y desorganizado inducido a partir de partes intactas de la planta y la estimulación por parte de reguladores internos o contenidos en el medio, promoviendo la división de células no especializadas (George *et al.*, 2008).



La generación de órganos a partir de tejidos organizados y callos, es llamada morfogénesis, evento que implica en un inicio la organización de células que no poseían dicha característica. Los tejidos morfogenéticos, son capaces de generar órganos adventicios, es decir, órganos originados a partir de tejidos somáticos, evento denominado organogénesis, formando tallos, raíces, hojas, flores o partes del perianto; o bien, generar embriones somáticos mediante el proceso denominado embriogénesis (George *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anterior se han establecido diversos métodos de micropropagación, en donde el tipo de explante utilizado y la respuesta del mismo son factores determinantes, estableciéndose los siguientes procedimientos (George *et al.*, 2008):

a) La propagación a partir de meristemas preformados se lleva a cabo a partir de yemas axilares (nudos simples o múltiples) o meristemas apicales de los tallos, cuya multiplicación se basa en la formación de múltiples ramas que podrían individualizarse y enraizarse para formar plantas completas. Estos explantes suelen tener mayor éxito cuando poseen el ápice y más de una yema lateral, es decir, la región apical, o bien, poseen más de dos nudos, aumentando su sobrevivencia y mostrando una mayor velocidad de crecimiento, para lo cual es necesario romper con la dormancia que dichas yemas poseen mediante la eliminación de la dominancia apical por la aplicación de reguladores de crecimiento o la remoción del ápice (George *et al.*, 2008).

b) La propagación por organogénesis directa se refiere a la formación de brotes adventicios a partir de un explante y no de un callo, lo cual depende de los fitorreguladores utilizados, del genotipo de la planta y órgano utilizado como explante, pudiéndose generar brotes a partir de hojas, raíces, tallos ó flores. La embriogénesis somática también puede generarse directamente, siendo más común a partir de explantes asociados al gametofito femenino. La presencia de

callos semiorganizados u organizados, es decir, que poseen una diferenciación celular generando un tejido uniforme con abundantes meristemos apicales que rodean a un conjunto de células especializadas en el aporte de nutrientes, ha sido contemplada en este rubro. Estos callos denominados también meristemoides o nódulos son capaces de generar órganos o plantas completas (George *et al.*, 2008).

c) La propagación por organogénesis indirecta, por su parte, no genera órganos a partir de la planta madre original o explante, pues previo a esto se forman callos cuyo potencial morfogénico puede variar. Los órganos generados comúnmente son raíces y tallos, los cuales no suelen formarse en cultivos líquidos, a diferencia de los embriones somáticos que se forman más frecuentemente a partir de callos que mediante el proceso de embriogénesis somática directa (George *et al.*, 2008).

En cualquiera de los métodos de micropropagación, los cultivos pueden mostrar diferentes patrones de crecimiento y diferenciación, un callo iniciado a partir de un nuevo explante, por ejemplo, pasa por 3 etapas (George *et al.*, 2008):

- inducción de la división celular,
- división celular activa en donde hay una desdiferenciación celular, y
- disminución y finalización de la división celular

La disminución de la división o elongación celular o el cese completo de la misma puede modificarse cuando los cultivos son transferidos a un medio nuevo y fresco, es decir, el subcultivo, manteniendo así el crecimiento continuo de los cultivos, ya sea de brotes o callos (George *et al.*, 2008).

## **Etapas de la Micropropagación**

El proceso de micropropagación vegetal puede diferenciarse en 5 etapas, cada una con puntos cruciales de los que dependerá un proceso exitoso de regeneración *in vitro* y que se describen a continuación (George *et al.*, 2008).

### **Etapa 0- Selección y preparación de la planta madre**

El resultado obtenido dependerá grandemente del origen de los explantes, es por esto que la planta madre seleccionada debe de ser un ejemplar que represente las características de la especie a cultivar y además, no poseer síntomas de enfermedad, pueden aplicarse tratamientos en contra de plagas y microorganismos nocivos que a su vez, han demostrado mejorar el crecimiento, morfogénesis y tasas de propagación *in vitro* (George *et al.*, 2008).

### **Etapa I- Establecimiento de cultivos asépticos**

Los explantes deben de someterse a un proceso de desinfección que elimine los contaminantes que poseen, pero que no reduzca la viabilidad del tejido. De esta manera, una vez que se obtenga el número adecuado de explantes vivos sin contaminación, se habrá superado esta etapa, que busca ser reproducible y alcanzar un éxito del 100% (George *et al.*, 2008).

### **Etapa II- Multiplicación**

La finalidad de esta etapa es generar las estructuras o propágulos adecuados que al ser individualizados, sean capaces de formar plantas completas o bien, mantener un nuevo ciclo de mutiplicación (George *et al.*, 2008).

### **Etapa III- Enraizamiento**

Debido a que las plantas provenientes de la etapa anterior no son capaces de sobrevivir por sí mismas si son transferidas a tierra u otro sustrato, la etapa III

permite hacerlas independientes de una fuente de carbohidratos, por lo que aquí se incluye una fase de enraizamiento (George *et al.*, 2008).

#### **Etapas IV- Transferencia a las condiciones naturales**

Debido a que los tallos son producidos en condiciones de alta humedad y baja intensidad lumínica, a menudo la cutícula de las hojas es más delgada y los estomas son poco funcionales, por lo cual las plantas cultivadas *in vitro* se deshidratan rápidamente cuando son transferidas a condiciones *ex vitro*. Lo anterior enfatiza la necesidad de hacer un cambio paulatino de las condiciones nutricionales, de humedad y luz que permita a las plantas sobrevivir en condiciones naturales, proceso denominado aclimatización (George *et al.*, 2008).

#### **Ventajas y Desventajas del Cultivo *in vitro***

Comparado con los métodos convencionales de propagación, el cultivo *in vitro* aporta las siguientes ventajas (George *et al.*, 2008):

- El cultivo puede iniciarse con una pequeña cantidad de material biológico.
- Puede llevarse a cabo en un espacio relativamente pequeño que además permite su almacén por largos periodos de tiempo.
- Se realiza en condiciones asépticas, permitiendo la generación de plantas libres de enfermedades.
- Provee independencia respecto a las condiciones ambientales, ajustando así las necesidades de nutrientes, reguladores de crecimiento, luz y temperatura para mantener la producción deseada, disminuyendo así el tiempo de obtención de las plantas.
- Permite producir y seleccionar variedades, manteniendo así la (s) característica (s) deseada mediante la generación de clones de plantas difíciles de propagar.

Sin embargo, diversas complicaciones pueden presentarse para el desarrollo de una propagación exitosa, entre las que se enumeran las siguientes (George *et al.*, 2008):

- La implementación del equipo adecuado es un proceso caro y especializado.
- Las plantas producidas son inicialmente pequeñas y pueden presentar características indeseables, no son capaces de realizar una fotosíntesis eficiente, por lo cual deben de pasar por un proceso de transición que les permita sobrevivir *ex vitro*, evento que muchas de ellas no son capaces de afrontar.
- La micropropagación genera clones y reduce la variación genética.
- La aplicación de reguladores de crecimiento puede generar modificaciones en las plantas difíciles de establecer.

### **Fitohormonas y Reguladores de Crecimiento**

Los compuestos endógenos capaces de regular el crecimiento y desarrollo de las plantas son llamados hormonas vegetales o fitohormonas, mientras que aquellas sustancias sintéticas con actividades fisiológicas similares se conocen como reguladores de crecimiento. Aunque han sido reconocidas muchas clases, son 5 los grupos principales: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico, siendo los primeros dos grupos los más importantes en relación a su actividad en el crecimiento y morfogénesis del cultivo de células, tejidos y órganos *in vitro*. A pesar de que su actividad puede generalizarse, ha sido evidente que ésta puede variar no sólo de planta a planta, sino de órgano a órgano, tejido a tejido, e inclusive célula a célula, siendo de particular importancia la edad y estado fisiológico de la planta madre, así como el grado de diferenciación celular (George *et al.*, 2008).

## Auxinas

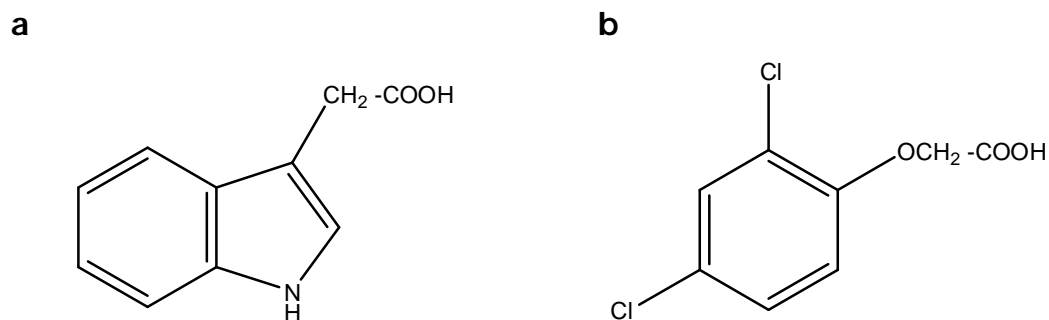
Su nombre proviene de la palabra griega *auxein* que significa "alargado" y "crecer". Las auxinas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular con anillos indólicos y aromáticos, cristalinos y poco solubles en agua, pero se disuelven fácilmente en solventes orgánicos y bases y ácidos débiles, siendo éstos de naturaleza ácida también (George *et al.*, 2008).

Las auxinas se generan a partir del triptofano producido por la vía del ácido siquímico, esta biosíntesis es intensa en las regiones meristemáticas y órganos jóvenes en crecimiento (yemas apicales, ápices radicales, hojas, flores, frutos y semillas inmaduras) (Taiz y Zeiger, 2006).

La producción de las auxinas disminuye con la edad y es afectada por factores ambientales como la luz (intensidad y fotoperiodo), ya que su nivel no es constante durante el día, que a su vez, puede obedecer a un ritmo interno. La concentración de auxinas depende también de la condición de la planta madre, así como de la estacionalidad. Al unirse covalentemente con otras moléculas, pierden su actividad de forma reversible, lo cual permite una regulación interna flexible (George *et al.*, 2008).

El transporte de las auxinas es basipétalo (Buchanan *et al.*, 2001), aunque en dicotiledóneas la concentración más alta se encuentra en la zona subapical del tallo (Taiz y Zeiger, 2006). Su unión con péptidos (glicina, alanina, etc.) genera amidas, mientras que su unión con carbohidratos (glucosa, ramnosa, etc.) produce esterios glicosilados, ambas formas permiten su transporte; así, la conjugación de las auxina parece tener la función de almacén, metabolizando así el exceso y protegiéndolo de su rompimiento oxidativo, ya sea mediante descarboxilación o la ausencia de ésta, eventos responsables de su degradación irreversible (Taiz y Zeiger, 2006).

El ácido indol-3-acético (AIA, figura 5a) es la auxina natural más común (Buchanan *et al.*, 2001), y comparte su naturaleza con el ácido 4-cloro indol-3-acético y el ácido 3-indol butírico (AIB), siendo entre estas hormonas vegetales, el ácido *n*-fenil acético (AFA) el más débil en cuanto a su actividad (Taiz y Zeiger, 2006). A excepción del ácido 3-indol acético (AIA; figura 5b), estas hormonas son muy estables y persistentes en el medio de cultivo, ya que el AIA es rápidamente oxidado en el medio y metabolizado en la planta. Sus análogos sintéticos, como el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y el ácido *n*-naftalen acético (ANA) no se oxidan pero si pueden conjugarse con la glucosa (Kende y Zeevaart, 1997). La aplicación de auxinas sintéticas interviene en los niveles de auxinas endógenas, particularmente la aplicación de 2,4-D y ANA promueven la disminución de AIA (George *et al.*, 2008). A pesar de que las actividades fisiológicas suelen ser similares, la magnitud de éstas pueden variar, siendo el 2,4-D, por ejemplo, de 8 a 12 veces más activo que el AIA (Razdan, 2003).



**Figura 5. a)** Estructura química del ácido indol-3-acético, y **b)** estructura química del ácido 2,4-diclorofenoxi acético.

Al establecer la relación concentración/actividad de las auxinas, suele generarse una curva en forma de campana, en donde altas concentraciones de auxinas son inhibitorias debido al aumento en la producción de etileno que éstas generan (George *et al.*, 2008).

A nivel celular, las auxinas promueven la elongación como resultado de un flujo de protones hacia el exterior de la célula (Davies, 2007). A su vez promueven la división celular mediante la expresión de genes que estimulan la replicación de DNA. En un nivel más amplio, y en combinación con las citocininas, las auxinas promueven la formación de meristemas (Taiz y Zeiger, 2006). Estimulan la diferenciación de los tejidos vasculares, yemas y raíces (Davies, 2007). La generación de raíces adventicias mediante la aplicación de IBA es frecuente, aunque se ha demostrado que esta hormona es rápidamente convertida en AIA por la planta (George *et al.*, 2008). La auxinas establecen y mantienen la polaridad y dominancia apical, además de mediar el tropismo y promover la elongación del tallo (Taiz y Zeiger, 2006).

En CTV la aplicación de auxinas genera complejos de respuestas únicos en función de su identidad, concentración, tiempo de inducción, combinación con otros reguladores de crecimiento y órgano tratado, siendo los resultados pocas veces transferidos a otros cultivos (George *et al.*, 2008).

Las auxinas son generalmente requeridas para la formación de callos, ya que promueven la desdiferenciación celular y comienzan el proceso de división, en dicotiledóneas, la adición simultánea de citocininas es de gran importancia. El 2,4-D suele utilizarse para la inducción de callo, sin embargo los cultivos que se mantienen en éste son genéticamente variables, por lo cual se recomienda el subcultivo a medios que contengan auxinas alternas. Las auxinas suelen inducir la dispersión de las células mientras que las citocininas promueven los agregados, además de la formación de clorofilas, hecho que las auxinas inhiben, siendo el 2,4-D la auxina con mayor actividad. Junto con las citocininas generan callos morfogénicos que forman brotes y embriones somáticos (Woodward y Bartel, 2005).



En los cultivos de órganos, bajos niveles de auxinas en combinación con altos de citocininas son de particular importancia en la etapa II de la micropropagación, aunque en algunos casos la presencia de citocininas es suficiente. La generación de raíces suele realizarse mediante la sola aplicación de auxinas, mientras que las citocininas exógenas la inhiben (George *et al.*, 2008).

La generación de embriones es alta cuando grandes concentraciones de auxinas son aplicadas, siendo el 2,4-D el más activo, aunque la promoción de las últimas fases de su desarrollo, es decir, la inducción de la etapa de torpedo, requiere frecuentemente de la eliminación externa de dichos reguladores (George *et al.*, 2008).

### **Citocininas**

El nombre citocinina proviene de "citocinesis", es decir, de división celular, hecho que también da el nombre a la cinetina (kin), primer regulador de crecimiento descubierto, con la capacidad de promover la proliferación celular, por lo cual, se agrupó a todos los compuestos con esta misma acción (Davies, 2007). Así, las citocininas comprenden a todas aquellas fitohormonas y reguladores de crecimiento cuyas principales actividades son: promover la síntesis de proteínas y controlar el ciclo celular, además promueven la maduración de cloroplastos y retrasan la senescencia de las hojas (Taiz y Zeiger, 2006).

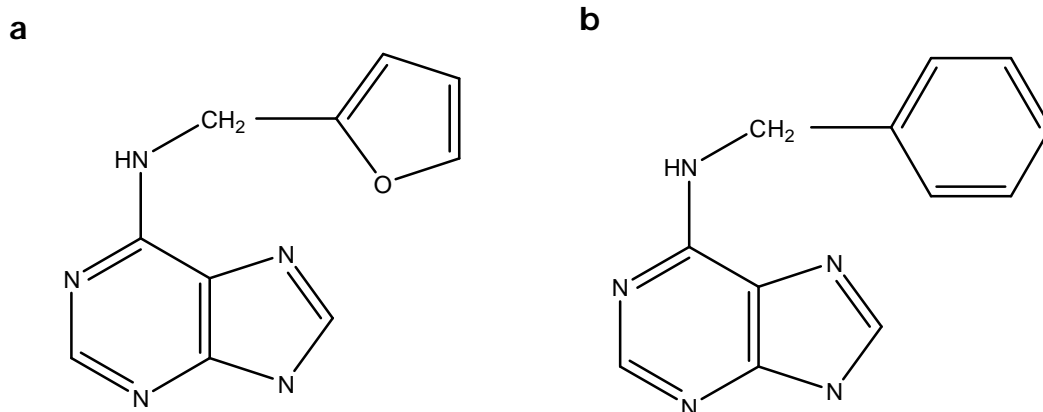
El ápice de la raíz es el sitio con mayor actividad de biosíntesis, pero otros tejidos en crecimiento pueden también generarlas, por lo cual su transporte es del tipo acropétalo (Kende y Zeevaart, 1997; Taiz y Zeiger, 2006).

Las citocininas se presentan como moléculas libres, pero también suelen estar asociadas a RNA´s de transferencia en el citoplasma y en los cloroplastos (George *et al.*, 2008).

Las citocininas son de naturaleza púrica (Kende y Zeevaart, 1997) y se presentan generalmente como bases nitrogenadas libres, ribósidos o nucleótidos, generados a partir de las rutas del acetato-mevalonato y metil eritrol fosfato (Buchanan *et al.*, 2001; Taiz y Zeiger, 2006). Cuando se inactivan se realiza en forma de O-glicosilación, reacción reversible (Kakimoto, 2003).

La Kin (figura 6a) aun no ha sido aceptada como fitohormona, refiriéndose a ella como la modificación de otros compuestos endógenos, sin embargo su presencia en las plantas, sin su aplicación exógena, se ha evidenciado. La zeatina y sus isómeros son las citocininas con mayor abundancia en la naturaleza, y a pesar de la ocurrencia de éstas, usualmente los tejidos u órganos cultivados poseen muy bajas cantidades por lo que es necesario adicionar análogos sintéticos para permitir el crecimiento, principalmente en cultivos de dicotiledóneas (George *et al.*, 2008). Dichos análogos suelen ser derivados de la adenina (Buchanan *et al.*, 2001), aunque algunos compuestos menos relacionados estructuralmente poseen actividades similares, como las alquil-aminopteridinas o bencil-oxipurinas, aunque la bencil aminopurina o bencil adenina (BA, figura 6b) es, en conjunto con la Kin, las más utilizadas en CTV (George *et al.*, 2008).

En cultivo de tejidos, al igual que en plantas intactas, la ausencia de citocininas produce que la metafase se prolongue, por lo cual se ha propuesto que éstas actúan regulando la síntesis de proteínas involucradas en la formación y funcionamiento del huso mitótico, por lo cual en los cultivos, la división celular es interrumpida. En aquellos cultivos de callos en donde no se han agregado citocininas externas, parece funcionar un mecanismo endógeno de producción hormonal. Las citocininas además, en altas concentraciones, promueven la producción de auxinas, permitiendo así, la proliferación celular regulada por ambas hormonas, haciendo evidente la relación proporcional que entre éstas debe existir y que permite así controlar el ciclo y el control de la diferenciación celular (George *et al.*, 2008).



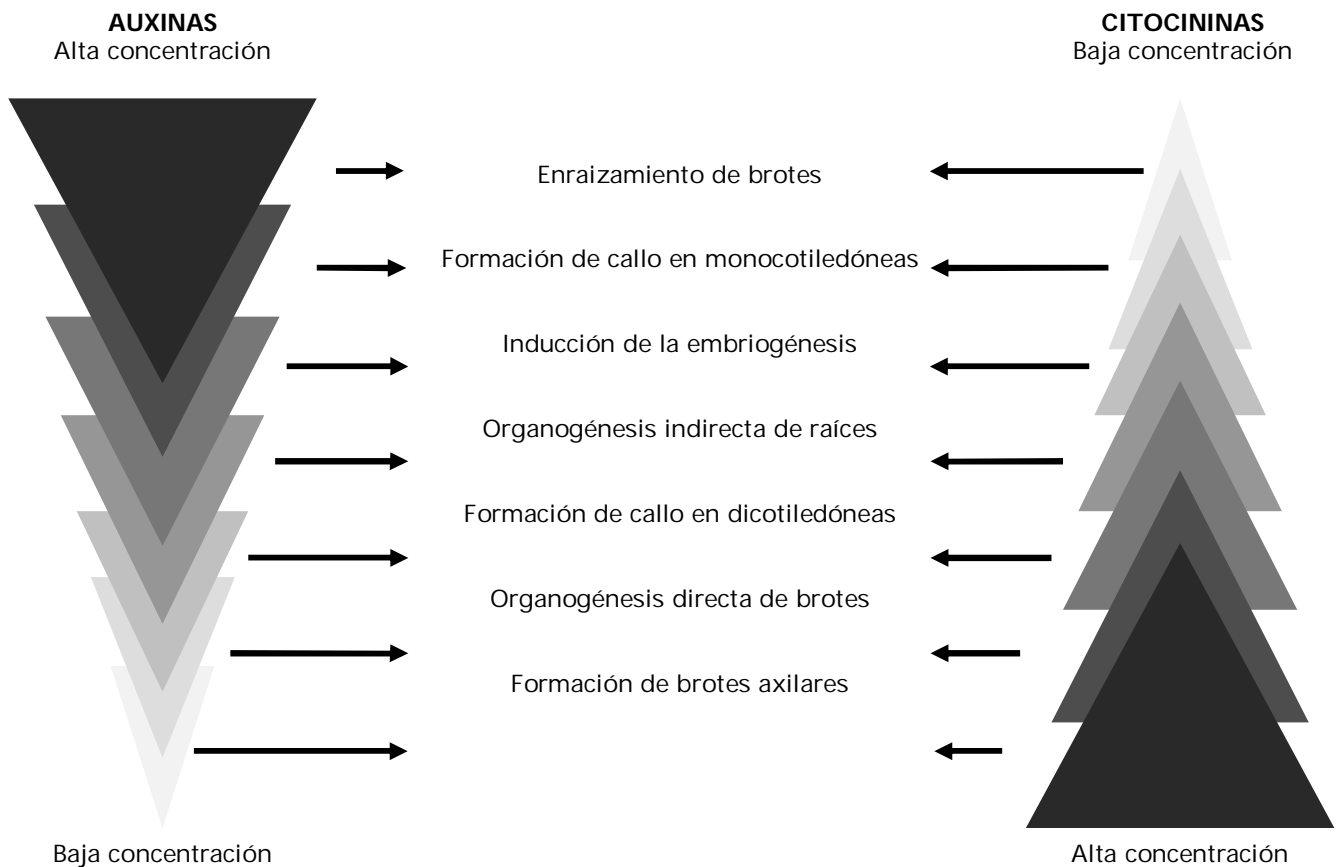
**Figura 6.** a) Estructura química de la cinetina, y b) estructura química de la bencil adenina.

Las citocininas promueven la organogénesis directa o indirecta de brotes, y al añadirse a los cultivos de regiones apicales, éstas superan la dominancia apical rompiendo así con la dormancia de las yemas axilares o generando brotes adventicios. En altas concentraciones son capaces de formar abundantes brotes cuya elongación es inhibida, además de provocar formas inusuales de las hojas en algunas especies, o causar la hiperhidratación de los brotes. La adición de citocininas también inhibe la formación de raíces, por lo cual su adición es omitida durante la etapa III de micropropagación, siendo necesario en diversas ocasiones, el subcultivo frecuente a medio basal para eliminar esta actividad (George *et al.*, 2008).

La adición de bajas concentraciones de dichos reguladores de crecimiento es capaz de inducir también la formación de callos embriogénicos (George *et al.*, 2008).

## Interacción auxina-citocinina

Las hormonas vegetales poseen efectos pleiotrópicos estando involucradas en un gran número de procesos fisiológicos (Davies, 2007), y cuyo efecto varía grandemente entre las especies. Además, una fitohormona puede afectar el metabolismo de otra, alterando así los niveles hormonales endógenos, que a su vez se influyen por el ambiente. De esta manera, se origina una complicada red de señalización que es capaz de generar una respuesta integrada, por lo cual es difícil predecir el efecto que cada hormona, o conjunto de éstas, producirá en los sistemas vegetales. No obstante, es de nuestro conocimiento que la interacción entre auxinas y citocininas es capaz de regular la diferenciación y organogénesis de los cultivos *in vitro*, por lo que el balance entre ambas definirá la respuesta. Dichos efectos han sido resumidos en la figura 7 (George *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Concentraciones relativas de auxinas y citocininas necesarias para el crecimiento y morfogénesis de los cultivos *in vitro*. Las posibles respuestas se muestran en la columna central. (Tomado de George *et al.*, 2008).

## **Producción de Metabolitos Secundarios por Cultivo de Tejidos Vegetales**

El cultivo de células, tejidos u órganos de una planta asume que cada uno de los componentes tiene la información genética y por lo tanto la capacidad de regenerar a una planta completa, de forma que la síntesis y degradación de los metabolitos primarios y secundarios presentes en las plantas debe de conservarse. Lo anterior ha sido ampliamente estudiado, comprobando que las plantas regeneradas *in vitro*, así como los cultivos de células en suspensión son capaces de generar diversos metabolitos. De esta forma, el estudio de la producción de compuestos del metabolismo secundario por medio del cultivo de tejidos vegetales se ha enfocado en la síntesis de productos medicinales permitiendo la obtención de éstos en un ambiente controlado independiente de las variaciones ambientales y organismo patógenos, con un control automatizado del crecimiento celular y regulación del metabolismo que contribuya al aumento de la producción y decremento en los costos (Sharp *et al.*, 1979).

A pesar de que cualquier compuesto producido naturalmente por la planta es generable en un cultivo *in vitro*, esta tarea no es sencilla, pues diversos factores influyen la producción de los compuestos secundarios (luz, nutrientes, hormonas, etc.), razón por la cual no todos los metabolitos secundarios con un uso amplio y con amplio potencial económico han podido producirse a gran escala. Ozeki (1996) logró establecer la correlación que hay entre la producción de antocianinas y la concentración de reguladores de crecimiento, concluyendo que la aplicación del 2,4-D es capaz de promover la formación de flavonoides en cultivos de zanahoria, efecto que a su vez, fue comprobado en cultivos en suspensión de uva, cuya concentración de quercetina aumentó con la adición del mismo regulador de crecimiento (Kokubo *et al.*, 2001), sin embargo, la presencia de ANA en cultivos de dicha planta, es capaz de disminuir la síntesis de antocianinas, mientras que el ácido abscísico la promueve (Jeong *et al.*, 2004). En cultivos de

*Oxalis linearis* la presencia de 2,4-D promovió la producción de antocianinas (Meyer y van Staden, 1995), y no así en cultivos de *Populus* sp., cuya producción de antocianinas es elevada con la eliminación del 2,4-D o su reemplazo por ANA o AIA (Ramachandra, 2002). La cinetina, estimuló la producción de antocianinas en cultivos en suspensión de *Haplopappus gracilis* pero la inhibe en *Populus* sp. (Mok *et al.*, 1976). De acuerdo a los resultados anteriores, es claro que la producción de metabolitos depende de diversos factores: la naturaleza de éste, la especie, tejido u órgano cultivados, y la concentración y el tipo del factor de regulación adicionado.

Diversas sustancias han sido producidas por este método, muchas de ellas en mayor cantidad que de forma natural, como insecticidas, pigmentos, proteínas, vitaminas, hormonas, alcaloides, edulcorantes, etc. (Staba, 1980). En la Tabla 4 se presenta una breve lista de poliacetilenos producidos en cultivos *in vitro*, estudiados en menor proporción que los flavonoides, compuestos que se muestran en la Tabla 5. En la Tabla 6, a su vez, se enlistan diversos metabolitos obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de algunas compuestas.

**Tabla 4.** Poliacetilenos obtenidos en cultivos *in vitro* de miembros del Reino Plantae

Especie	Poliacetileno	Tipo de cultivo	Referencia
<i>Lobelia cardinalis</i>	Lobetiol	cultivos de pelos radicales	Yamanaka <i>et al.</i> , 1996
<i>Pratia nummularia</i>	Lobetiol	callo y cultivos de pelos radicales	Ishimaru <i>et al.</i> , 2003
<i>Panax ginseng</i> x <i>P. quinquefolium</i>	panaxinol, panaxidol y 1,8-heptadecadieno-3,10-diol	cultivos de pelos radicales	Washida <i>et al.</i> , 2003

**Tabla 5.** Flavonoides obtenidos en cultivos *in vitro* de miembros del Reino Plantae

<b>Especie</b>	<b>Flavonoide (s)</b>	<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Ajuga reptans</i>	cianidina	células en suspensión	Callebaut <i>et al.</i> , 1990
<i>Glycine max</i>	apigenina	células en suspensión	Hahlbrock, 1972
<i>Fagopyrum esculentum</i>	rutina	pelos radicales	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>Centaurea cyanus</i>	cianidina	células en suspensión	Takegawa <i>et al.</i> , 1987
<i>Glehnia littoralis</i>	cianidina	callos y células en suspensión	Miura <i>et al.</i> , 1998
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	equinatina, licodiona, 7,4'-dihydroxiflavona, formononetina	células en suspensión	Ayabe <i>et al.</i> , 1980
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	retrochalconas preniladas, licoagrochalconas, aurona prenilada, licoagroaurona, licochalcona, kanzonol, glicirdiona, licoagrosida	pelos radicales	Li <i>et al.</i> , 2000
<i>Haplopappus gracilis</i>	cianidina	células en suspensión	Fritsch y Grisebach, 1975
<i>Hemidesmus indicus</i>	rutina	callos y ápices	Misra <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypericum calycinum</i>	hiperforina	células en suspensión	Klingauf <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypericum perforatum</i>	hiperosina, rutina, quercetina	cultivos en suspensión, callos, raíces y brotes	Pasqua <i>et al.</i> , 2003
<i>Ipomoea batatas</i>	cianidinas	callo y células en suspensión	Konczak-Islam <i>et al.</i> , 2000
<i>Maclura pomifera</i>	naringenina, lupinifolila, 5,4'-dihidroxi-2",2"-dimetilpirano-{5",6";7,8]-titaranona, 8-c-prenilnarioenina, alpinuraisoflavona, wigteona, parvisoflavona, cycloartocarpesina, 2,4,2',4'-tetrahidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-chalcona	callo y células en suspensión	Delle Monache <i>et al.</i> , 1995

<b>Especie</b>	<b>Flavonoide (s)</b>	<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Medicago truncatula</i>	afroformosina, biocanina, daidzeina, formononetina, 2'-hidroxiformononetina, genisteina, irilona, irisolidona, 7,4'-dihydroxiflavona, 5,3'-dimetoxiluteolina, tricina, medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina, liquiritigenina, naringenina, hispidol	raíces y cultivos en suspensión	Farag <i>et al.</i> , 2007
<i>Passiflora quadrangularis</i>	orientina, isorientina, vitexina, isovitexina	callos	Antognoni <i>et al.</i> , 2007
<i>Petroselinum hortense</i>	apigenina, luteolina, crisoeriol, quercetina e isorhamnetina	células en suspensión	Kreuzaler y Hahlbrock, 1973 Hahlbrock <i>et al.</i> , 1976
<i>Phaseolus aureus</i>	daidzeina y 2',4,4"-trihydroxichalcona	callos y células en suspensión	Berlin y Barz, 1971
<i>Polygonum hydropiper</i>	catequina	callo y células en suspensión	Ono <i>et al.</i> , 1998
<i>Pueraria lobata</i>	genisteina y daidzeina	callo	Matkowski, 2004
<i>Pueraria tuberosa</i>	genisteina y daidzeina	callo	Vaishnav <i>et al.</i> , 2006
<i>Sophora flavescens</i>	8-prenilnaringenina y leachianona G, sophoraflavanone G, lupalbigenina, 6,3-dimetil isoflavona	células en suspensión	Zhao <i>et al.</i> , 2003 Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
<i>Saussurea involucreta</i>	apigenina	pelos radicales	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Scutellaria baicalensis</i>	baicalina	pelos radicales y células en suspensión	Nishikawa <i>g.</i> , 1999
<i>Vaccinium myrtillus</i>	antocianinas y protoantocianidinas	callo	Madhavi <i>et al.</i> , 1998
<i>Vitis vinifera</i>	peonidina, cianidinas, malvidina, cianidina, delphinidina, pelargonidina camperol y quercetina	callo	Afifi <i>et al.</i> , 2003 Bao-Do <i>et al.</i> , 1995



**Tabla 6.** Metabolitos secundarios obtenidos en cultivos *in vitro* de miembros de la familia Asteraceae

Especie	Compuesto	Tipo de cultivo	Referencia
<i>Anthemis nobilis</i>	Isovalerato de geranilo	raíces adventicias	Omoto <i>et al.</i> , 1998
<i>Carthamus tinctorius</i>	kinobeaon	células en suspensión	Kanehira <i>et al.</i> , 2003
<i>Centaurea cyanus</i>	cianidina	células en suspensión	Kakegawa <i>et al.</i> , 1987
<i>Chamomilla recutita</i>	eudesmol, berkeiaraduleno, isovalerato de geranilo, cedrol	raíces	Szöke <i>et al.</i> , 2004
<i>Cynara cardunculus</i>	cinarina, ácido clorogénico	callo	Trajtemberg <i>et al.</i> , 2006
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	piretrinas	callo y brotes	Hitmi <i>et al.</i> , 2000
<i>Haplopappus gracilis</i>	cianidina	células en suspensión	Fritsch y Grisebach, 1975
<i>Helianthus tuberosus</i>	4,4-dimethyl esteroides, cicloartenol y 24-metilen cicloartanol	tubérculos	Hartmann <i>et al.</i> , 1972
<i>Eupatorium rugosum</i>	isopentenacetofenonas	células en suspensión	Lin y Heinstejn, 1974
<i>Piqueria trinervia</i>	2-metil-7,7-dimetilbicyclo (3,3,1) heptano-4,6-diol	células en suspensión	Saad <i>et al.</i> , 2000
<i>Saussurea involucreta</i>	apigenina	pelos radicales	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Tagetes</i> spp.	piretrinas tiofenos	callo y brotes	Hitmi <i>et al.</i> , 2000 Ketel, 1978
<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	piretrinas	callo	Cashyap <i>et al.</i> , 1978
<i>Vernonia cinerea</i>	alcaloides	callos, células en suspensión y raíces	Maheshwari <i>et al.</i> , 2007

## **Cultivo *in vitro* de dalias**

Aunque la familia Asteraceae es una de las más conocidas (Balleza y Villaseñor, 2002), el género *Dahlia* no ha recibido extensos estudios de regeneración *in vitro*, basándose la mayoría de los tratados en la importancia de las dalias en la horticultura, prestando poca atención para aquellas especies silvestres (Sorensen, 1969), siendo el CTV ampliamente utilizado como una estrategia en el control fitosanitario en dalias.

### **Desinfección del material biológico**

Usualmente las plantas que crecen en un ambiente externo se encuentran contaminadas con microorganismos o plagas, los cuales suelen ser superficiales. Puesto que los cultivos *in vitro* se realizan en un medio nutritivo, dichos organismos, principalmente hongos y bacterias, compiten de forma adversa con el material vegetal en crecimiento, por lo cual es necesario mantenerlas en condiciones libres de contaminantes desde el primer contacto entre el material vegetal y el medio de cultivo, condición que puede lograrse mediante la aplicación de diversos químicos desinfectantes (George *et al.*, 2008).

Los trabajos pioneros referentes a la regeneración *in vitro* de dalias (Morel y Martin, 1952; Mullin y Schlegel, 1978; Wang *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 1990, citado en González, 1999) no indican los métodos de desinfección de los explantes.

Hernández (1993) estableció un método de cultivo *in vitro* de dalias, sin embargo no mencionó el nombre de las especies que trabajó. Dicho autor realizó dos métodos diferentes de desinfección, en el primero, elaborado para ápices vegetativos y florales, realizó un enjuague con agua corriente, sumergiéndolos posteriormente en etanol al 70% durante 1 min, después en una solución de cloro comercial al 30% (v/v) y Tween-20 durante 25 min, realizando finalmente 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. El segundo método elaborado para los

receptáculos florales jóvenes únicamente varió en el tiempo de exposición a la solución de hipoclorito de sodio y Tween-20, en donde permanecieron por 40 min.

González (1999) es quien por primera vez aplicó un tratamiento de desinfección y fertilización a las plantas madre, pues la condición que éstas presentan influye de forma directa en la sobrevivencia y respuesta de los explantes ante el cultivo y las condiciones *in vitro*. Además de los contaminantes superficiales, existen diversos microorganismos, como bacterias y virus, que son sistémicos, y debido a que los métodos de desinfección previos a la siembra son superficiales, el crecimiento de plantas madre en condiciones adecuadas y la aplicación de diversos antibióticos minimizan la infección, y por lo tanto aumentan la probabilidad de establecer cultivos asépticos (George *et al.*, 2008). De esta forma González (1999) sometió a ejemplares de *Dahlia excelsa* Benth y *Dahlia imperialis* Roetzl a una mezcla de 0.5 g/l de Cuprimicin 500, 1 g/l de Benlate y 0.5 ml/l de Tamaron, reduciendo de esta forma los problemas de plagas y enfermedades. Además realizó una fertilización con Triple 17 cada dos meses. Dicho autor utilizó las zonas apicales, a las cuales aplicó un lavado con agua corriente y jabón durante 5 min, posteriormente las sumergió en alcohol al 70% por un tiempo aproximado de 1 min, después de lo cual el material se introdujo en una solución (v/v) de hipoclorito de sodio equivalente al 2.5% de ingrediente activo por 10 min, finalizando con 4 enjuagues en agua desionizada y estéril en condiciones asépticas.

De forma similar Zaragoza (2004) planteó un método de desinfección para las semillas de *D. imperialis*, de las cuales obtuvo los cotiledones como explantes. Las semillas se enjuagaron en agua corriente con jabón durante 5 min, después de lo cual se aplicó una solución del fungicida Benlate en una concentración de 1g/l durante 5 min, posteriormente se sumergieron en alcohol al 70% durante 1 min y finalmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% (v/v) durante

10 min. A pesar de lo cual reportó un 35% de contaminación que no pudo ser reducido.

### **Aislamiento y tamaño de los explantes**

Diversas sustancias esenciales para el correcto funcionamiento celular, como alcaloides, aminoácidos, enzimas, hormonas vegetales y vitaminas, son capaces de difundir a través de la membrana, por lo que su pérdida puede representar un problema para el establecimiento de los cultivos. Sin embargo, cuando la densidad celular o el material vegetal en el medio permiten la adecuada proximidad celular, dichos efectos pueden reducirse o eliminarse. La iniciación exitosa del cultivo depende entonces de un tamaño mínimo del explante o de un radio adecuado de células por unidad de volumen del medio de cultivo, por lo que los explantes de mayor tamaño sobreviven con mayor frecuencia que aquellos con un volumen menor (George *et al.*, 2008)

Hernández (1993) diferenció el tamaño de los explantes de acuerdo al órgano utilizado, de esta forma cultivó ápices de 1-2 mm de longitud cubierto con primordios foliares y yemas florales de 3-4 mm de diámetro. Por el contrario, escogió a los receptáculos de 3-4 cm de diámetro haciendo diversos cortes que permitieron aislar y sólo cultivar la parte central del disco dividida en dos segmentos, cada con un área de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>.

González (1999), por su parte, utilizó una mayor cantidad de explantes de *D. excelsa* y *D. imperialis* con las siguientes dimensiones: tallos 0.5-0.8 cm<sup>2</sup> cortados a la mitad, hojas 0.5-1 cm<sup>2</sup>, yemas laterales (nudos), ápices 1 cm<sup>2</sup>, peciolos 1-1.5 cm de longitud, botones florales (completos), lígulas 2-2.5 cm, y tubulígulas 1.5-2 cm.

Zaragoza (2004) obtuvo los explantes de *D. imperialis* directamente de la germinación de las semillas *in vitro*, utilizando cotiledones de 0.8-1 cm de longitud, los cuales fueron seccionados transversalmente en 2 ó 3 fragmentos.

A partir del aislamiento de los explantes antes mencionados, y la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección, se lograron establecer los siguientes resultados.

### **Regeneración de plantas y enraizamiento**

El primer trabajo de cultivo *in vitro* de dalias, fue realizado por Morel y Martin (1952), quienes cultivaron meristemas apicales con la finalidad de eliminar el virus del mosaico de dalias. Ellos obtuvieron brotes de 1 mm en el medio con base en la solución de Knop 50% con 2% de glucosa y 0.5 mg de extracto de levadura, sin embargo dichas plantas no generaron raíces.

Mullin y Schlegel (1978) cultivaron meristemas apicales de *Dahlia pinnata* Cav. con el mismo objetivo que Morel y Martin (1952), utilizando el medio con base en la solución de Knop usando 2 tratamientos: a) AIA 1 mg/l y b) AIA 2.5 mg/l + Kin 0.1 mg/l. De 102 meristemas sólo 19 crecieron hasta formar una planta completa y 13 sobrevivieron al trasplante, el cual fue realizado en una mezcla de tierra de hoja, *Sphagnum* sp. y vermiculita.

Wang y colaboradores (1988) cultivaron meristemas apicales y yemas axilares de *D. pinnata* en medio MS líquido y sólido, suplementado con diferentes combinaciones de ANA, IPA, Kin y GA<sub>3</sub>. Obtuvieron un 95% de sobrevivencia en el medio suplementado con ANA 0.2 ó 0.5 mg/l + IPA 0.2 mg/l + Kin 0.5 mg/l + GA<sub>3</sub> 1 mg/l. Finalmente realizaron dos tratamientos para promover el enraizamiento: 1) ANA 0.5 mg/l con carbón activado 2 g/l, y b) IBA 1 mg/l más IPA 0.2 mg/l; logrando este efecto en 40-92% de las plantas dependiendo del cultivar utilizado.

Wei y colaboradores (1990; citado en González, 1999) obtuvieron mayor crecimiento de brotes en medio MS con 10 mg/l de GA<sub>3</sub> + 50 mg/l de sulfato de adenina, sin embargo no hacen mención de la posible generación de raíces en las plantas obtenidas.

Hernández (1993) utilizó ápices y yemas florales como explantes, los cuales fueron cultivados en medio MS suplementado con inositol 100 mg/l, tiamina 1 mg/l, azúcar 30 g/l y agar 8 g/l. Aplicó diferentes tratamientos hormonales para cada tipo de explante y como resultados reportó diferencias significativas entre ellos.

De esta manera, Hernández (1993) indicó que únicamente logró la formación de un brote por ápice, que la mayor longitud de éste fue 18.42 mm en promedio, así como el mayor porcentaje (41%) de presencia de raíces fueron alcanzados en el tratamiento de 0.1 mg/l de AIA sin BA, y concluyó que hubo una relación directa entre el aumento en la concentración de AIA y el aumento en la longitud del brote y la presencia de raíces. Sin embargo y a pesar de no especificar después de qué periodo de tiempo realizó la evaluación de las respuestas antes mencionadas, sí indicó que en un lapso de 2 meses obtuvo como promedio 28.67 mm en la longitud de los brotes, siendo ésta la mayor medida en comparación al resto de los tratamientos. También hizo una evaluación de la pigmentación que presentaron los explantes y concluyó que ésta se debió a la formación de antocianinas cuya presencia fue directamente proporcional al aumento en la concentración de BA. Por otro lado, describió que sólo el 25% de las yemas florales cultivadas fueron capaces de producir un brote a partir de la porción lateral del botón en el medio suplementado con 0.1 mg/l de AIA con 0.25 mg/l de BA.

En la fase de enraizamiento, este autor aplicó un solo tratamiento que contenía 0.1 mg/l de AIA, a partir del cual, después de un mes, sólo el 18.6% de las plantas formaron raíces de aproximadamente 31.33 mm.

Además de las variables mencionadas, Hernández (1993) encontró una gran diversidad en otras características de las plantas obtenidas, ya que presentaron de 1 a 4 nudos con una longitud de los entrenudos de 1.4 a 4.16 cm, hojas simples o compuestas (tri o pentafoliadas), de 2 a 5 raíces fibrosas por planta y en algunos casos un sola raíz principal con varias raíces secundarias.

González (1999) realizó el cultivo *in vitro* de 2 dalias arborescentes, *D. imperialis* y *D. excelsa*, ambas en medio MS, utilizando ápices y yemas axilares. En dicho estudio se encontró un alto porcentaje de oxidación, sobre todo en las yemas apicales, ya que este fenómeno se presentó en el 80% de los explantes, a pesar de haber realizado enjuagues previos a la siembra con una solución de ácido cítrico 75 mg/l, ácido ascórbico 50 mg/l y L-cisteína 25 mg/l, lo cual se redujo mediante la aplicación de los mismos compuestos, pero directamente en el medio de cultivo y con un aumento en la concentración de las mismas a 150, 150 y 100 mg/l respectivamente. La adición de 10 g/l de carbón activado y el uso de un medio de cultivo líquido permitió reducir también este problema aunque se siguieron obteniendo valores altos de oxidación.

El efecto de IBA en las yemas axilares también fue evaluado y se demostró que sólo en *D. excelsa* se obtuvo un mayor crecimiento en el medio de cultivo con sales a 100% y 0.03 mg/l de IBA. La aplicación de 3 mg/l de GA<sub>3</sub> y 50 mg/l de sulfato de adenina favoreció el crecimiento de las yemas axilares cuyos valores más altos, alrededor de 3.51 cm, fueron obtenidos en *D. imperialis*.

Finalmente, González (1999) evaluó la formación de raíces mediante la aplicación de AIA, encontrando que después de 15 días y mediante la aplicación de 0.5 mg de esta hormona se lograba un porcentaje de enraizamiento de hasta 60% en ambas especies, aumentando en esta misma concentración la longitud de las raíces. La aplicación de carbón activado para este mismo fin resultó en la brotación de raíces pero en el doble del tiempo en el que se presentó para

aquellos tratamientos con AIA, además las raíces fueron más delgadas aunque con mayores ramificaciones.

La evidente problemática que presentaron los cultivos realizados para producir plantas completas, es decir, plantas con raíces permitieron a Read y Fellman (1985) recomendar el enraizamiento de dalias propagadas *in vitro* mediante una cámara de nebulización, puesto que este método permitió una alta sobrevivencia y desarrollo de las plantas mediante el mantenimiento de la humedad relativa alta.

### **Formación de callo**

Mullin y Schlegel (1978) fueron los primeros autores en reportar la formación de callo en el 81.37% de los meristemas apicales cultivados de *D. pinnata*, esto mediante el uso del medio con base en la solución de Knop y 2 tratamientos: a) AIA 1 mg/l y b) AIA 2.5 mg/l + Kin 0.1 mg/l. Algunos de estos callos formaron raíces, sin embargo no se menciona la proporción en la cual se presentó dicha organogénesis.

Read y Gavilertvatana (1976) cultivaron segmentos de hojas de *D. pinnata* en medio MS adicionado con tiamina 0.5 mg/l, piridoxina 0.5 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, glicina 2 mg/l y *mio*-inositol 100 mg/l. Mediante la combinación de diferentes concentraciones de cinetina y ANA, obtuvieron callos, cuya formación inició en el extremo proximal de las hojas y continuó hacia la superficie adaxial de éstas. Dichos autores señalaron que hubo una mayor formación de callo en los explantes que contenían la venación central de la hoja, y que la formación de esta masa celular se llevaba a cabo en el medio suplementado con 1 mg/l de cada hormona después de 2 semanas de cultivo. En un trabajo posterior, Gavilertvatana y colaboradores (1982) cultivaron estos callos, así como segmentos de hojas en medio MS suplementado nuevamente con ANA y cinetina a diferentes concentraciones. Lo anterior demostró que la producción de etileno se



relacionaba directamente con la concentración de ANA, ya que únicamente con 1 mg/l de esta hormona, y no con 5 ó 10 mg/l, la producción se elevaba considerablemente.

Wang y colaboradores (1988) reportaron la formación de callos en presencia de concentraciones altas de ANA (1.5 ó 2 mg/l), al cultivar meristemos apicales y yemas axilares de *D. pinnata* en medio MS líquido.

Hernández (1993) cultivó receptáculos de dalias, probablemente *D. pinnata*, en medio MS suplementado con inositol 100 mg/l, tiamina 1 mg/l, azúcar 30 g/l y agar 8 g/l, en donde obtuvo callo en un medio libre de hormonas, que al permanecer en éste durante un periodo de 3 meses no presentó ningún tipo de organogénesis.

González (1999) exploró el potencial regenerativo de peciolos, botones florales y flores liguladas de *D. imperialis* y *D. excelsa* en medio MS, con 10 g/l de carbón activado, 100 mg/l de ácido cítrico, 75 mg/l de ácido ascórbico y 50 mg/l de L-cisteína como antioxidantes, y 1 mg/l de BA. Sin embargo todos los explantes se oxidaron, alcanzando un daño del 100% en un periodo de 5 a 20 días.

González (1999) indujo la formación de callos a partir de hojas y tallos, obteniendo oxidación del 80% de los explantes de hoja, por lo cual, empleó los mismos tratamientos aplicados a los ápices y yemas axilares descritos en el apartado anterior, obteniendo poco éxito, puesto que los valores de oxidación permanecieron muy altos. Los callos fueron obtenidos mediante la aplicación de diferentes concentraciones de BA, cinetina y 2iP, concluyendo que la hormona BA, en cualquiera de las concentraciones usadas, promovía un mayor crecimiento de callo en ambos explantes, a pesar de que en tallos no se lograron obtener callos compactos. También se evaluó el crecimiento y la posible organogénesis por la aplicación de BA en combinación con IBA después de 2 meses de realizado el

subcultivo, sin embargo sólo hubo un crecimiento en el volumen del callo sin presencia de oxidación, aunque no se encontró una diferencia significativa en los distintos tratamientos y en ninguno de ellos se obtuvo la formación de brotes. La aplicación de GA<sub>3</sub> y sulfato de adenina tampoco promovió el crecimiento del callo ni la brotación, ya que se obtuvo la formación de un brote sólo en un callo, por lo que este proceso se asoció al control hormonal interno del tejido.

Recientemente, Zaragoza (2004) realizó el cultivo *in vitro* de cotiledones de *D. imperialis* en medio MS adicionado con inositol 100 mg/l y tiamina 40 mg/l, además de diferentes concentraciones de AIA, ANA, TDZ y 2,4-D; en los cuales también obtuvo porcentajes de oxidación de hasta 53.3%. De acuerdo a este autor se presentaron tres tipos de respuestas: 1) callo, 2) tejido cotiledonar que no presentaba formación de callo, y 3) tejido con respuesta, con engrosamientos o protuberancias. De esta forma concluyó que el tratamiento que logró una mayor formación del callo fue 0.5 mg/l de AIA + 0.5 mg/l de 2,4-D.

Para la etapa de proliferación, los callos obtenidos se sometieron a diferentes concentraciones de AIA y cinetina. El nivel de oxidación y necrosamiento fue menor para los callos cultivados en el medio sin fitorreguladores, así como en el tratamiento que contenía las concentraciones más altas de hormonas, es decir 0.3 mg/l de AIA y Kin, aunque al evaluar la formación de brotes, éstos se presentaron en tres tratamientos diferentes: a) AIA 0.1 mg/l + Kin 0.3 mg/l, b) AIA 0.3 mg/l sin cinetina, y c) AIA 0.3 mg/l + Kin 0.1 mg/L. Sin embargo no se realizó un análisis estadístico de dichos resultados. La etapa final de este trabajo, es decir, el enraizamiento de los brotes no se llevó a cabo debido a su completa oxidación.

De esta forma, únicamente se ha realizado el cultivo *in vitro* de dos especies silvestres del género *Dahlia*: *D. imperialis* y *D. excelsa*, refiriéndose el resto de los tratados, a *D. pinnata* (dalia cultivada). Como se mencionó anteriormente, México posee la mayor diversidad de especies de dalias, siendo 31 de las 34 existentes, endémicas de nuestro territorio (Mera y Bye, 2006). La existencia de *D. tenuicaulis* y *D. brevis*, se encuentra en una condición crítica, siendo su conservación un área prioritaria que permitirá su conservación y estudio, por lo que es necesario señalar que éste, representa uno de los pocos estudios de regeneración mediante CTV de dalias silvestres y el único en el que se evalúa la producción de flavonoides en cultivos *in vitro* de callos regenerados a partir de hojas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido al cambio de uso de suelo por urbanización, actividades agrícolas y de ganadería, así como de su recolección, *D. tenuicaulis*, se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-ECOL-2001), mientras que *Dahlia brevis*, se ha reportado como especie cuyas poblaciones naturales han sido erradicadas (Bye, com. per.), situación que es aun más crítica debido a que ambas son endémicas de México (Sorensen, 1969). La distribución de ambas especies es restringida y habitan ambientes cuya tasa de deforestación es sumamente alta (CONAFOR, 2007), por lo que se prevee una rápida desaparición de estas especies. Lo anterior enfatiza la necesidad de su estudio y conservación. En este ámbito, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) nos permite (i) explorar el potencial regenerativo de distintos tejidos y la posibilidad de obtener gran cantidad de individuos a corto y largo plazo; (ii) mantener germoplasma; y (iii) explorar la producción de metabolitos secundarios (Roca y Mroginski, 1991). De esta forma el CTV es una opción viable para la propagación de dichas especies, con la finalidad de generar conocimientos sobre éstas, así como sentar las bases sobre su conservación y aprovechamiento sostenible. Al mismo tiempo, se podrían establecer diferencias morfogénicas asociadas al hábito de crecimiento de cada especie, ya que *D. brevis* es herbácea y *D. tenuicaulis* arbustiva.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Establecer un protocolo para la regeneración y propagación *in vitro* de *Dahlia* spp., basado en la generación de conocimientos morfogénéticos de las especies en estudio, que permitan su conservación y sentar las bases para un aprovechamiento sostenible.

### Objetivos Particulares

- Establecer un método de regeneración, enraizamiento y aclimatización de *Dahlia brevis* y *Dahlia tenuicaulis*.
- Describir el efecto de auxinas y citocininas en la regeneración *in vitro* de *Dahlia brevis* y *Dahlia tenuicaulis*, a partir de regiones apicales, nudos, entrenudos y segmentos de hojas.
- Describir las respuestas morfogénéticas en *Dahlia brevis* y *Dahlia tenuicaulis*, y establecer las diferencias entre éstas.
- Establecer un protocolo para la obtención de callo en *Dahlia brevis* y *Dahlia tenuicaulis*, con la finalidad de detectar la presencia de flavonoides.

## 5. HIPÓTESIS

- Si las células de *D. brevis* y *D. tenuicaulis* son totipotentes, éstas serán capaces de regenerar plantas completas al cultivarse regiones apicales y nudos *in vitro*.
- Debido a la diferencia de formas de vida y ambientes en que las especies *D. brevis* y *D. tenuicaulis* se desarrollan, los tejidos cultivados tendrán diferentes respuestas morfogénicas.
- Los callos formados a partir de hojas y tallos de *D. brevis* y *D. tenuicaulis*, serán capaces de producir flavonoides, metabolitos secundarios que se presentan en los tejidos de las plantas silvestres y cultivadas de ambas especies.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo *in vitro*

#### Material biológico

Las especies cultivadas fueron: *Dahlia tenuicaulis* y *D. brevis*. Las plantas de *D. tenuicaulis* se obtuvieron a partir de 5 fascículos de raíces tuberosas donados por el M. en C. José Mejía, derivados del material vivo colocado en el Repositorio Nacional de Germoplasma de *Dahlia*, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo en colaboración con el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Las plantas de *D. brevis* fueron proporcionados por la Colección de Trabajo de *Dahlia* y provienen de cultivos *in vitro* depositados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, derivados de una planta viva rescatada en Calpulalpan, Estado de México, como parte del "Inventory and conservation of wild species of *Dahlia*", proyecto colaborativo entre el Jardín Botánico de la Universidad de Hamburgo, Alemania, y el Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, y financiado por la fundación Zeit-Stifung.

Las raíces tuberosas (figura 8a) se plantaron a 5 cm de profundidad en tierra de hoja húmeda previamente esterilizada y se regaron cada 3 días. Para conseguir la cantidad deseada de explantes, es decir 100 de cada tipo, se podaron las yemas



**Figura 8.** a) Raíces tuberosas de *D. tenuicaulis* con un brote en crecimiento. b) activación de yemas axilares por efecto del corte de las regiones apicales.

apicales de las plantas cuando los brotes alcanzaron una longitud de 10 a 20 cm, para promover el crecimiento de las yemas axilares (figura 8b).

### **Obtención de Explantes**

Los explantes utilizados fueron: a) yemas apicales, b) nudos, c) hojas inmaduras, y d) secciones de entrenudos. Dichas estructuras se obtuvieron a partir de los tallos jóvenes, en *D. tenuicaulis* con una longitud de 10 a 12 cm, y en *D. brevis* de 2 a 3 cm. El tamaño de los explantes dependió de las características de los mismos, de acuerdo a lo siguiente:

- a) Regiones apicales: yema con un nudo,
- b) Nudos: sección de 0.5 cm debajo de la yema axilar,
- c) Hojas: 1 cm<sup>2</sup> para *D. tenuicaulis*, y una hoja completa para *D. brevis*,
- d) Entrenudos: 1 cm de longitud.

### **Desinfección**

Para lograr la desinfección adecuada de los explantes, los tallos jóvenes de aproximadamente 10 cm de longitud se lavaron con agua corriente durante 5 min en agitación constante, para eliminar residuos superficiales. Posteriormente se sumergieron en una solución de etanol 70% durante 30 seg, inmediatamente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) 20% (v/v) durante 10 min. Finalmente dentro de una campana de flujo laminar se sometieron a tres enjuagues durante 1-2 min cada uno, con agua destilada esterilizada y se enjuagaron 3-5 min en una solución antioxidante de ácido ascórbico con ácido cítrico 150 mg/l de cada uno.

### **Cultivo**

Todos los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación a  $25 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 16 h luz, con una intensidad de 1200 lux.



Cada uno de los tratamientos contó con 10 repeticiones, cuya unidad experimental fue un explante, sin embargo en algunos casos éstas disminuyeron debido a la falta de material biológico.

Las mediciones para las variables, a continuación descritas, se realizaron cada 15 días durante un periodo de cultivo total de 60 días, ya que al término de éste fue necesario el subcultivo del 15% de las plantas de *D. tenuicaulis*, evento que no permitió continuar con la confrontación de los datos entre los tratamientos y entre las especies. Se hizo un análisis de cada periodo de tiempo para evaluar las diferencias en la curva de crecimiento de los 90 tratamientos aplicados a cada una de las dos especies estudiadas.

Para establecer diferencias significativas en las respuestas de los tejidos a los distintos tratamientos se realizó una prueba ANOVA y el análisis de comparación de medias de Tukey mediante los programas estadísticos MINITAB 14 y SPSS 15.0 para Windows.

### **Cultivos para la regeneración de plantas**

Las regiones apicales y nudos se cultivaron en medio MS 50%, con PVP 500 mg/l, con un pH de 5.7, solidificado con Phytigel 4 g/l y con distintas concentraciones de citocininas: cinetina (Kin) y benciladenina (BA), de acuerdo a lo establecido en la tabla 7. Los explantes se mantuvieron en dicho medio de inducción durante 15 y 30 días, después de lo cual se colocaron en un medio basal libre de hormonas.

Los datos analizados para establecer el crecimiento de las regiones apicales y los nudos, fueron la longitud de los brotes y la cantidad de nudos que éstos formaron. Además se examinó la posible correlación entre la longitud y el número de nudos, así como de la longitud y el número de brotes generados en las plantas mediante el índice de correlación bilateral de Pearson, que nos permitió reconocer

la asociación entre dichas variables. Además se registró la coloración y morfología de los brotes generados.

### **Cultivos para la formación de callo**

Las hojas y los entrenudos se colocaron en el medio de inducción MS 50%, con PVP 500mg/l, con un pH de 5.7 y solidificado con Phytigel 4g/l; al cual se adicionaron distintas concentraciones de citocininas: Kin y BA; y auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (tabla 8).

La respuesta obtenida a partir de los tratamientos para la inducción de callo en tallos y hojas se midió en base al volumen obtenido, registrándose también la coloración, consistencia de los mismos y la presencia o ausencia de organogénesis.

### **Cultivo para la proliferación celular y de brotes a partir de callo**

Los callos obtenidos se sometieron a tres diferentes medios de cultivo (tabla 9). De esta forma, los callos de cada tratamiento se dividieron en tres grupos, de forma que uno de ellos se subcultivó al medio basal, otro grupo a un medio de origen, y finalmente otro grupo a un medio que contenía sólo las citocininas y en igual concentración del medio de origen. Lo anterior con la finalidad de inducir la formación de brotes. Los tratamientos que fueron sometidos a esta prueba se seleccionaron a partir del volumen de callo obtenido en la etapa anterior, de forma que al menos se pudieran obtener 5 repeticiones para cada uno de los grupos, colocando una sección de 1 cm<sup>3</sup> de callo por repetición.

La respuesta obtenida a partir de los tratamientos aplicados para promover la proliferación de los callos y evaluar la formación de brotes se evaluó en base al volumen obtenido, registrándose también la coloración, consistencia de los mismos y la presencia o ausencia de organogénesis.

**Tabla 7.** Tratamientos utilizados para el establecimiento *in vitro* y regeneración de brotes a partir de regiones apicales y nudos.

Tratamiento	Citocininas (mg/l)	Tiempo de inducción (días)
1	-	
2	BA 0.5	
3	BA 1.0	15 días
4	KIN 0.5	
5	KIN 1.0	
6	-	
7	BA 0.5	
8	BA 1.0	30 días
9	KIN 0.5	
10	KIN 1.0	

**Tabla 8.** Tratamientos utilizados para el establecimiento *in vitro* e inducción de callo a partir de hojas y entrenudos.

Tratamiento	Auxinas (mg/l)	Citocininas (mg/l)
1	-	-
2	2,4-D 0.5	
3	-	BA 0.5
4	2,4-D 0.5	
5	-	BA 2.0
6	2,4-D 0.5	
7	-	KIN 0.5
8	2,4-D 0.5	
9	-	KIN 2.0
10	2,4-D 0.5	

**Tabla 9.** Tratamientos utilizados en la inducción de un mayor crecimiento de callo y la formación de brotes a partir de éste.

Tratamiento	Medio de Origen		Medio de Subcultivo	
	Auxinas (mg/l)	Citocininas (mg/l)	Auxinas (mg/l)	Citocininas (mg/l)
1.1	-	-	-	-
1.2			-	BA 0.5
1.3			-	BA 2.0
1.4			-	KIN 0.5
1.5			-	KIN 2.0
2.1	2,4-D 0.5		-	-
2.2			2,4-D 0.5	-
3.1	-	BA 0.5	-	-
3.2			-	BA 0.5
4.1	2,4-D 0.5		-	-
4.2			2,4-D 0.5	BA 0.5
4.3			-	BA 0.5
5.1	-	BA 2.0	-	-
5.2			-	BA 2.0
6.1	2,4-D 0.5		-	-
6.2			2,4-D 0.5	BA 2.0
6.3			-	BA 2.0
7.1	-	KIN 0.5	-	-
7.2			-	KIN 0.5
8.1	2,4-D 0.5		-	-
8.2			2,4-D 0.5	KIN 0.5
8.3			-	KIN 0.5
9.1	-	KIN 2.0	-	-
9.2			-	KIN 2.0
10.1	2,4-D 0.5		-	-
10.2			2,4-D 0.5	KIN 2.0
10.3			-	KIN 2.0

## **Enraizamiento**

Los tratamientos para inducir un proceso de enraizamiento en los brotes obtenidos se realizaron mediante la modificación de la concentración de auxinas: ácido indol-3-acético (AIA), así como la inclusión de carbón activado (tabla 10).

La evaluación de los tratamientos para enraizamiento se realizó mediante 3 parámetros: número de raíces, grosor y longitud de éstas. Las mediciones para cada variable se realizaron cada 15 días únicamente por un periodo de 30 días, pues en el siguiente periodo, es decir, 45 días, el crecimiento en longitud fue considerable en todos los tratamientos, evento que no permitió la toma de datos debido a la poca diferenciación entre raíces primarias y secundarias. De esta forma se hizo un análisis de cada uno de los dos periodos de tiempo para evaluar las diferencias entre los 4 tratamientos aplicados a cada una de las dos especies estudiadas.

**Tabla 10.** Tratamientos utilizados para la etapa de enraizamiento de los brotes obtenidos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Carbón Activado (g/l)</b>	<b>Auxinas (mg/l)</b>
<b>1</b>	-	-
<b>2</b>	1	-
<b>3</b>	-	AIA 2.0
<b>4</b>	-	AIA 0.5

## **Aclimatización**

Las plantas que desarrollaron raíces se colocaron en macetas con tres diferentes sustratos previamente esterilizados: tierra de hoja, *Sphagnum* sp., y una mezcla 50:50 de dichos componentes. Los individuos se mantuvieron a una humedad relativa alta, mediante un riego periódico; eventualmente fueron

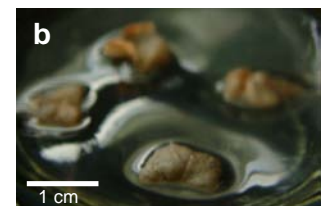
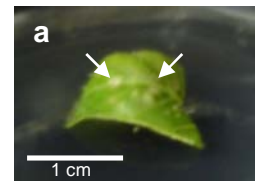
asperjados con una solución de agua destilada adicionada con TRICON (200 ml/l) para evitar la proliferación de hongos que alteren el crecimiento y vigor de la planta. Dichos riegos se redujeron paulatinamente. El sustrato de aquellas plantas cultivadas en *Sphagnum* sp. se reemplazó finalmente por tierra de hoja y se colocaron en un invernadero con humedad y temperatura ambiente.

### **Pruebas Preliminares**

Las pruebas preliminares descritas a continuación permitieron establecer el método detallado anteriormente.

### **Desinfección de los explantes: *D. tenuicaulis***

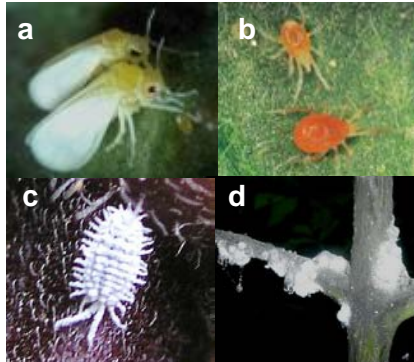
Al realizar el método descrito anteriormente, se obtuvo un éxito de 100% en la desinfección en las primeras pruebas, ya que ninguno de los cultivos mostró contaminación. Las regiones apicales no tuvieron daños evidentes debido al método de desinfección sin embargo se observó el deterioro de algunos explantes provenientes de hojas, los cuales mostraban clorosis en forma de círculos pequeños bien definidos (figura 9a), provocando, en aquellos explantes con un tamaño menor a 1 cm<sup>2</sup>, su muerte en un periodo de aproximadamente 14 días (figura 9b), problema que se superó mediante el ajuste del tamaño de los explantes (ver apartado 6.2).



**Figura 9.** a) Explantes de hojas con clorosis (flechas) debido al proceso de desinfección. b) Explantes necrosados después de dos semanas de cultivo.

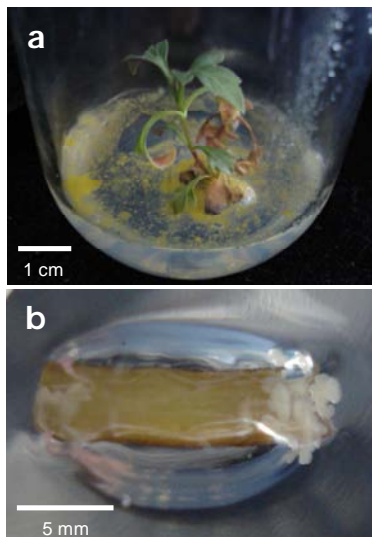
Por otro lado, a pesar de no observarse daños en los nudos y entrenudos provocados por el método de desinfección, la presencia de tres plagas, mosca blanca, araña roja y cochinilla algodonosa (figura 10), provocaron la introducción de bacterias sistémicas en las cinco plantas madre. Las plagas se trataron con FURADAN (5 gotas del concentrado por litro de agua), insecticida de amplio espectro, que a pesar de mejorar la salud de las plantas, no terminó por completo

con las plagas, de forma que se recurrió al uso diario de un insecticida natural cuya constitución se muestra en el Anexo 1. Este evento modificó ampliamente el suministro de todos los explantes, ya que a pesar de lograrse la eliminación de las plagas, las plantas no se encontraban en buen estado y se marchitaron, por lo que



**Figura 10.** Plagas encontradas en las plantas madres de *D. tenuicaulis*: a) mosca blanca, b) araña roja, c y d) cochinilla algodonosa o blanca.

los explantes rescatados no estaban en condiciones adecuadas y en la mayoría de ellos hubo una respuesta negativa ante el cultivo *in vitro*, de forma que se necrosaron, eliminándose todas las repeticiones de los tratamientos que se realizaron a partir de estos explantes, de forma que los tratamientos se realizaron a partir del material biológico obtenido de los nuevos brotes de las plantas madre.



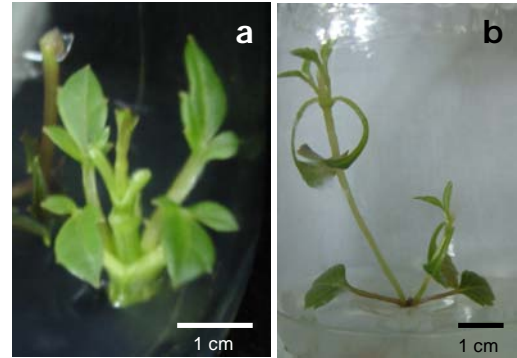
**Figura 11.** Contaminación presentada después de aproximadamente 30 días de cultivo en a) nudos y b) tallos.

Las regiones apicales, nudos, entrenudos y hojas no mostraron problemas de contaminación y respondieron adecuadamente al sistema de desinfección superficial, sin embargo en el caso de los nudos y entrenudos, se presentó hasta un 80% de contaminación (figura 11), el cual se hizo evidente después de aproximadamente 30 días de cultivo, lo cual indicó que las bacterias sistémicas aun estaban presentes en las plantas madre, y que se presentaban en estos tejidos debido a la vascularización de los mismos. Debido a la inexperiencia en el trato de infecciones mediante antibióticos en plantas silvestres, el problema de contaminación se abordó mediante el uso del primer

nudo y entrenudo adyacentes a la región apical, reduciendo la probabilidad de que estos estuvieran contaminados por las bacterias sistémicas, teniendo un éxito de 90%.

## Tamaño de los explantes

El establecimiento del tamaño de las regiones apicales se realizó debido a una respuesta diferencial entre éstos, ya que en aquellos que por su tamaño se cultivaron manteniéndose unidos a un nudo, se observó un crecimiento continuo, así como la activación de las yemas axilares en la mayoría de estos (figura 12a), mientras que las regiones apicales aisladas no crecieron y se hiperhidrataron. Los nudos y entrenudos, por su parte, respondieron al cultivo adecuadamente, sin mostrar daños por los cortes realizados. Los tallos mostraron un ensanchamiento constante, mientras que las yemas axilares de los nudos se activaron observándose un crecimiento de los brotes (figura 12b).



**Figura 12.** Cultivos *in vitro* de *D. tenuicaulis*. **a)** Región apical cultivada y con crecimiento de brotes a partir de las yema axilares; **b)** Crecimiento de brotes a partir de yemas axilares.

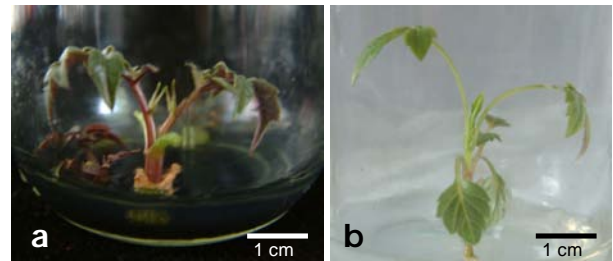
El tamaño de los explantes provenientes de las hojas de *D. tenuicaulis* se estableció de acuerdo a las condiciones de la etapa de desinfección, ya que aquellos explantes con un tamaño aproximado de  $0.5 \text{ cm}^2$ , se necrosaron después de 2 semanas de cultivo, lo cual fue atribuido al daño sufrido durante la etapa anterior, de forma que finalmente se obtuvieron explantes de  $1 \text{ cm}^2$ , los cuales respondieron adecuadamente al cultivo, presentando crecimiento intervenal que se hizo evidente mediante el encurvamiento de la hoja. Por otro lado, debido a que el área foliar de *D. brevis* es pequeña, este explante se obtuvo a partir de hojas completas, cortándolas sólo en la base para separarlas de los tallos y evitar la presencia de yemas axilares, ya que las plantas de *D. brevis* regeneradas *in vitro* poseen peciolo casi imperceptibles.



## Medio de cultivo

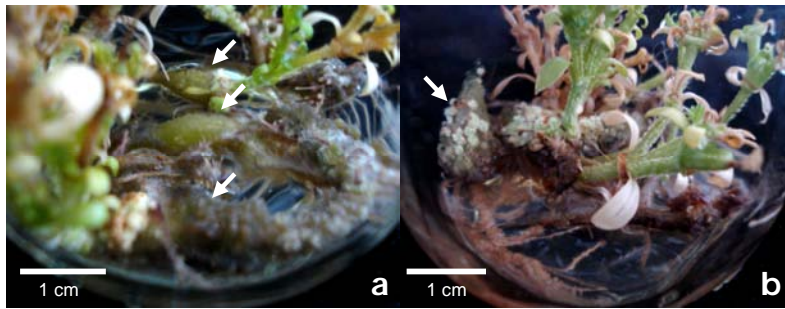
Como medida de prevención hacia la oxidación de los explante provenientes de *D. tenuicaulis*, se colocó 1 g/l de carbón activado en el medio de cultivo. Los resultados, en este ámbito, fueron positivos, sin embargo, los explantes mostraron un crecimiento lento acompañado por la pigmentación rojiza de los brotes (figura 13a). Además, todos los explantes de hojas murieron en un tiempo promedio de 2 semanas. Es probable que este efecto se deba a la retención de nutrientes por parte del carbón activado, ya que éste posee una alta capacidad de absorción de compuestos orgánicos, iones y sales (Thomas, 2008). Así, la falta de nutrientes, ha mostrado elevar la producción de metabolitos secundarios en diversas especies de plantas (Inderjit *et al.*, 1994).

De esta forma, la falta de precisión en cuanto a la cantidad y mecanismo de retención de nutrientes y hormonas en el medio de cultivo, eliminó la posible aplicación del carbón activado, a pesar de su capacidad antioxidativa (Thomas, 2008), por lo que se probó la adición de 500 mg/l de polivinilpirrolidona (PVP), antioxidante que permitió el crecimiento adecuado de los explantes (figura 13b) y la reducción de la pigmentación de los mismos.



**Figura 13.** Crecimiento de las regiones apicales en dos diferentes medios de cultivo: **a)** regiones apicales con crecimiento lento y pigmentación rojiza en medio de cultivo con carbón activado; **b)** regiones apicales con crecimiento rápido en medio con PVP.

La presencia de carbón activado en los cultivos de *D. brevis* no tuvo el mismo efecto, ya que los brotes no presentaban ningún tipo de pigmentación, sin embargo se detectó una disminución en su crecimiento. A pesar de lo anterior, en cultivos de nudos y brotes con una antigüedad de seis meses en los cuales el medio de cultivo había disminuido considerablemente, se advirtió la formación de raíces tuberosas (figura 14), evento nunca antes reportado en cultivo *in vitro* de dalias, los cuales al ser subcultivados, mostraron una crecimiento abundante de



**Figura 14.** Cultivo *in vitro* de *D. brevis* con formación de raíces tuberosas (flechas), en su mayoría fotosintéticos (**a** y **b**). Algunos mostraban formación de callo (**b**) a partir de su superficie.

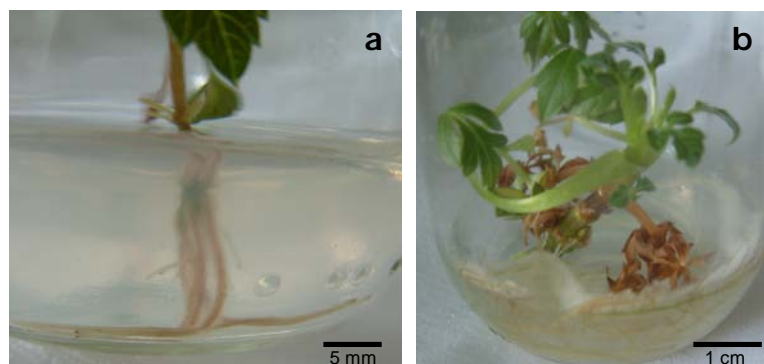
brotos y de raíces primarias y secundarias, así como la formación de cayo a partir de dichas raíces tuberosas.

Sin embargo, y con la finalidad de estandarizar las condiciones de crecimiento

para ambas especies, el medio de cultivo establecido para la propagación *in vitro* fue: MS 50%, pH 5.7, adicionado con 500 mg/l de PVP, 30 g de sacarosa y solidificado con 4.5 g/l de Gelrite.

### Enraizamiento

El enraizamiento de los brotes de ambas especies parece ser espontáneo, ya que sin la adición de hormonas o la presencia de carbón activado se ha observado el crecimiento de raíces abundantes. A pesar de que este evento, en *D. tenuicaulis*, sólo se presentó en un brote proveniente de las plantas madre (figura 15a), aquellos que fueron subcultivados a partir de plantas establecidas *in vitro*, formaron en su mayoría raíces abundantes (figura 15b).



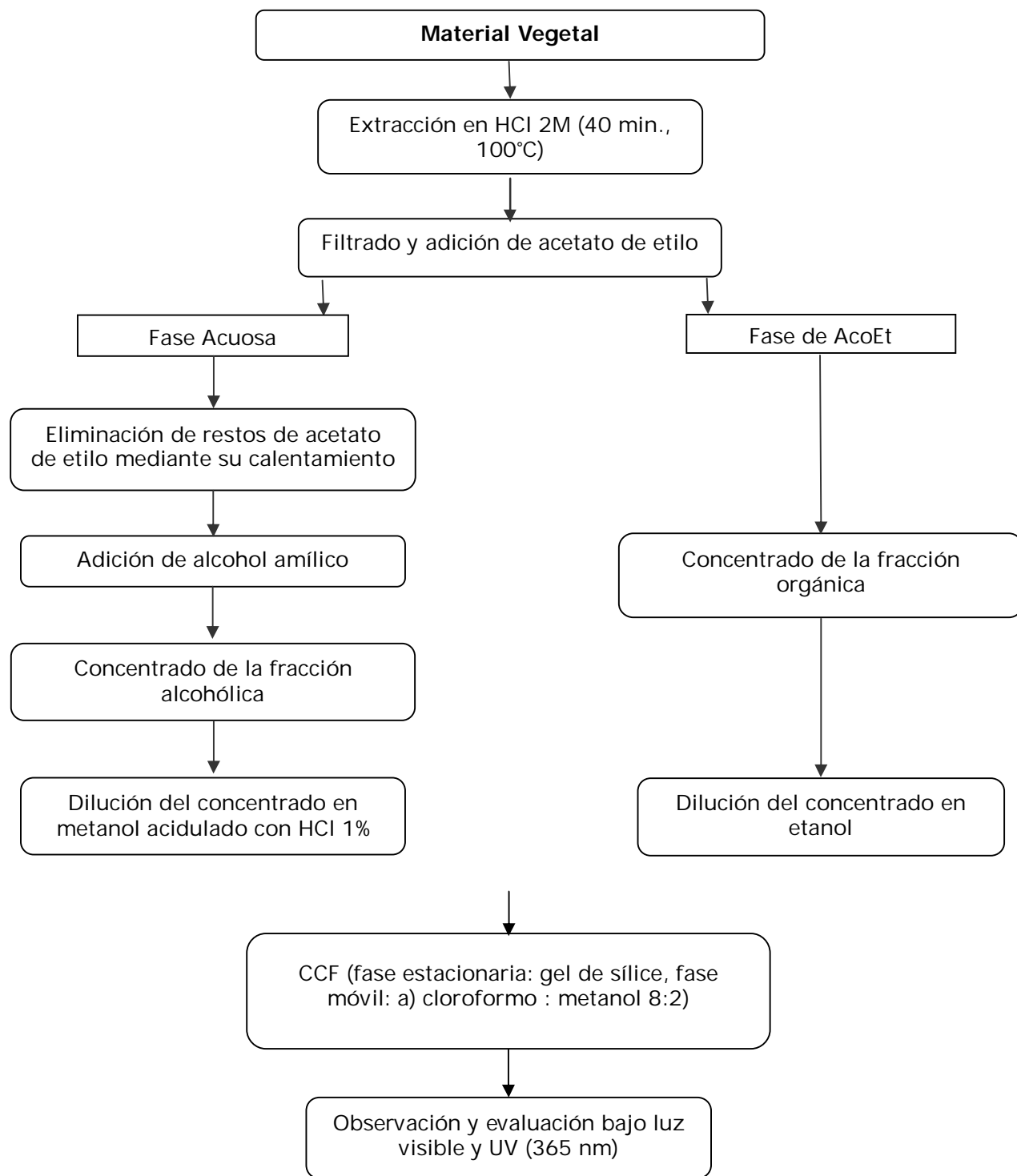
**Figura 15.** Formación de raíces en brotes obtenidos a partir de explantes de la planta madre (**a**) y brotes de cultivos establecidos *in vitro* (**b**) de *D. tenuicaulis*.

## Análisis Fitoquímico

La extracción y detección de flavonoides, descrita en la figura 16, se realizó a partir de plantas y callos cultivados *in vitro* y plantas de invernadero de *D. tenuicaulis*, y plantas y callos cultivados *in vitro* de *D. brevis*.

La detección de flavonoides por cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas de gel de sílice de 0.2 mm de grosor, como fase móvil se utilizó una mezcla de cloroformo : metanol (8:2), y se emplearon los siguientes flavonoides como estándares: acacetina, apigenina, camperol, luteolina, naringenina, quercetina y propenona (tabla 11), todos ellos presentes en especies del género *Dahlia*. Los cromatogramas se evaluaron mediante su observación en luz visible y la aplicación de radiación UV (365 nm), en donde se observaron los patrones de coloración característicos para cada grupo de flavonoides de acuerdo a Harborne (1984 y 1989), y descritos a continuación:

1. *Antoncianidinas*: color malva, rojo y anaranjado en luz visible.
2. *Flavonoles*: amarillo brillante en luz visible; café oscuro o negro bajo luz UV.
3. *Flavonas*: marrón o café intenso bajo luz UV; amarillo-verdoso brillante bajo luz UV y amonio.
4. *Chalconas*: rojo profundo o anaranjado brillante bajo luz UV y amonio.
5. *Auronas*: amarillo brillante o verdoso bajo luz UV; anaranjado brillante o rojo bajo luz UV y amonio.
6. *Flavanonas*: malva profundo bajo luz UV; amarillo-verdoso brillante o amarillo pálido bajo luz UV y amonio.



**Figura 16.** Método de detección de flavonoides en los callos de *D. tenuicaulis* y *D. brevis*.  
Fuente: Harborne *et al.*, 1975 y Harborne, 1984.

**Tabla 11.** Referencias utilizadas para la detección de flavonoides en CCF

<b>Nombre</b>	<b>Clave</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Pureza</b>
<b>Acacetina</b>	00017	Fluka	≥97% (HPLC)
<b>Apigenina</b>	A3145	Sigma-Aldrich	95% (CCF)
<b>Camperol</b>	K0133	Sigma-Aldrich	≥90% (HPLC)
<b>Luteolina</b>	L9283	Sigma-Aldrich	≥98% (CCF)
<b>Naringenina</b>	N5893	Sigma-Aldrich	≥95%
<b>Quercetina</b>	Q3001	Sigma-Aldrich	≥78%
<b>Propenona</b>	56165	Fluka	≥98% (HPLC)

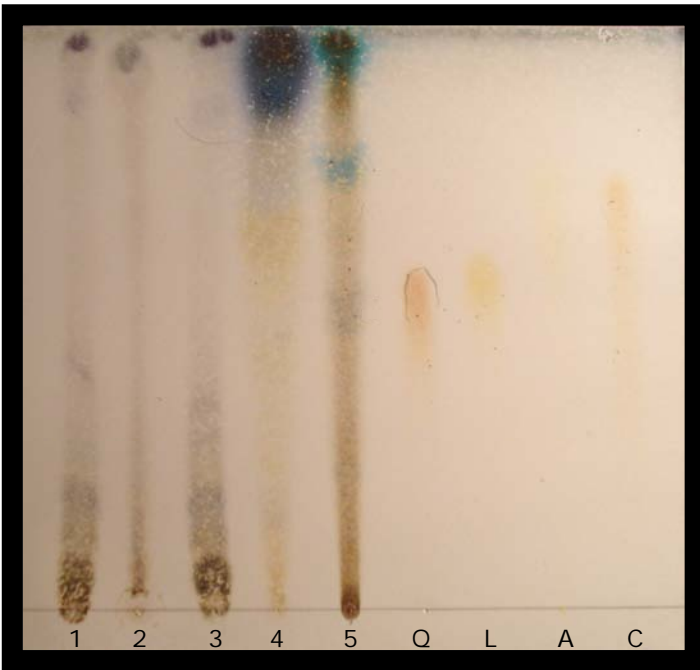
Posteriormente las placas se revelaron mediante la aplicación de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% en etanol (p/v).

### **Pruebas Preliminares**

Las pruebas preliminares descritas a continuación permitieron establecer el método detallado anteriormente. Es importante señalar que dichas pruebas se realizaron con el extracto total obtenido a partir de los callos de *D. tenuicaulis*, debido a la alta disponibilidad de material en relación a *D. brevis*.

### **Extracción**

La extracción se estableció mediante el macerado de los callos en 4 diferentes disolventes: metanol, metanol acidulado (HCl 1%), etanol y solución acuosa de HCl 2M. Las primeras tres extracciones fueron menos eficientes puesto que el rendimiento de los extractos fue mucho menor, lo cual se hizo evidente cuando realizamos la CCF (figura 17).

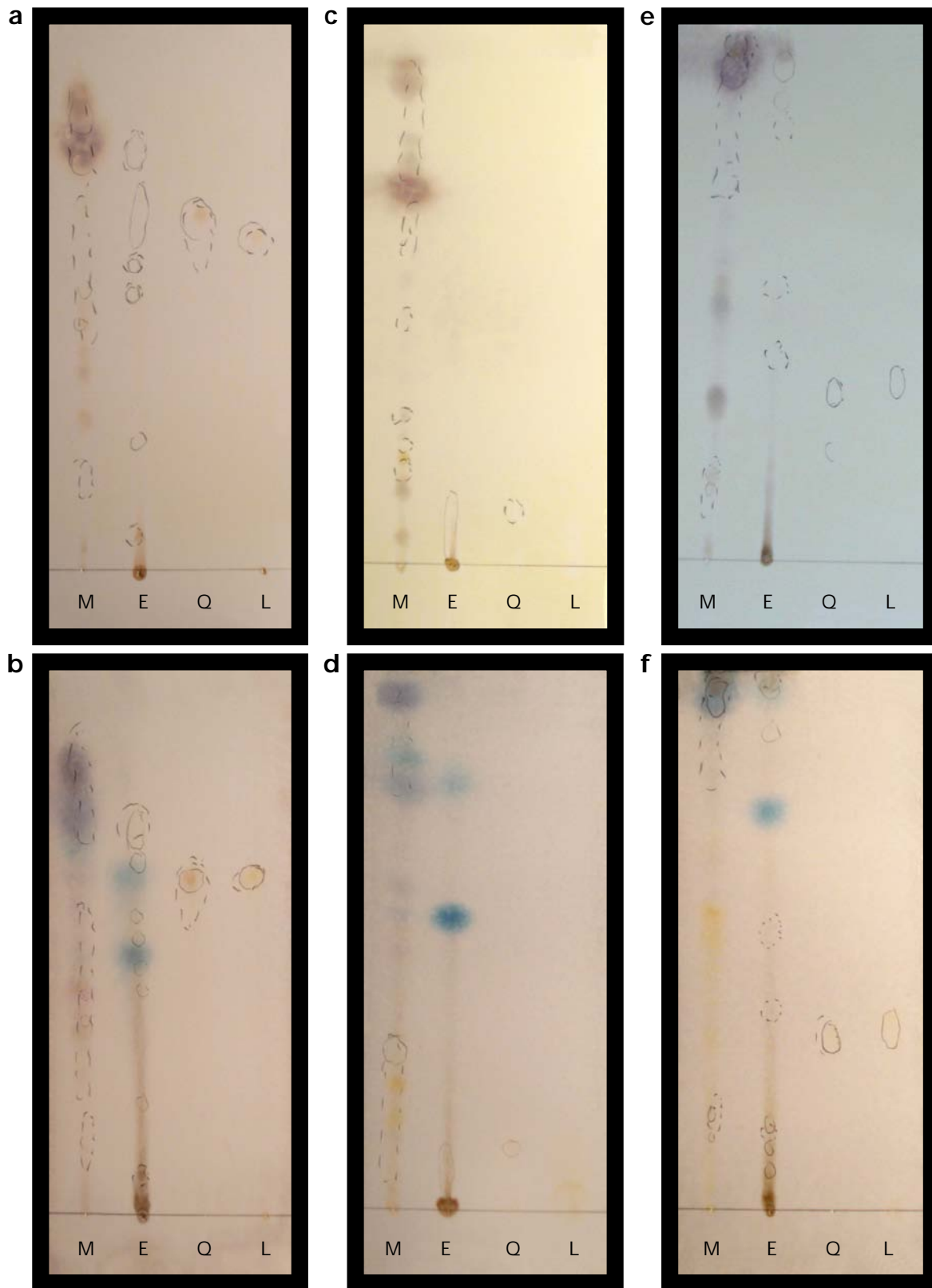


**Figura 17.** Cromatograma de los extractos 1) metanólico, 2) metanólico acidulado, 3) etanólico, y de las fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso ácido (HCl 2M), es decir 4) fracción orgánica de alcohol amílico y 5) fracción orgánica de acetato de etilo. Lo anterior fue comparado con la referencias de quercetina (Q), luteolina (L), apigenina (A) y camperol (C). En 1, 2 y 3 se puede observar la baja concentración del extracto, mientras que en 4 y 5 es mucho mayor.

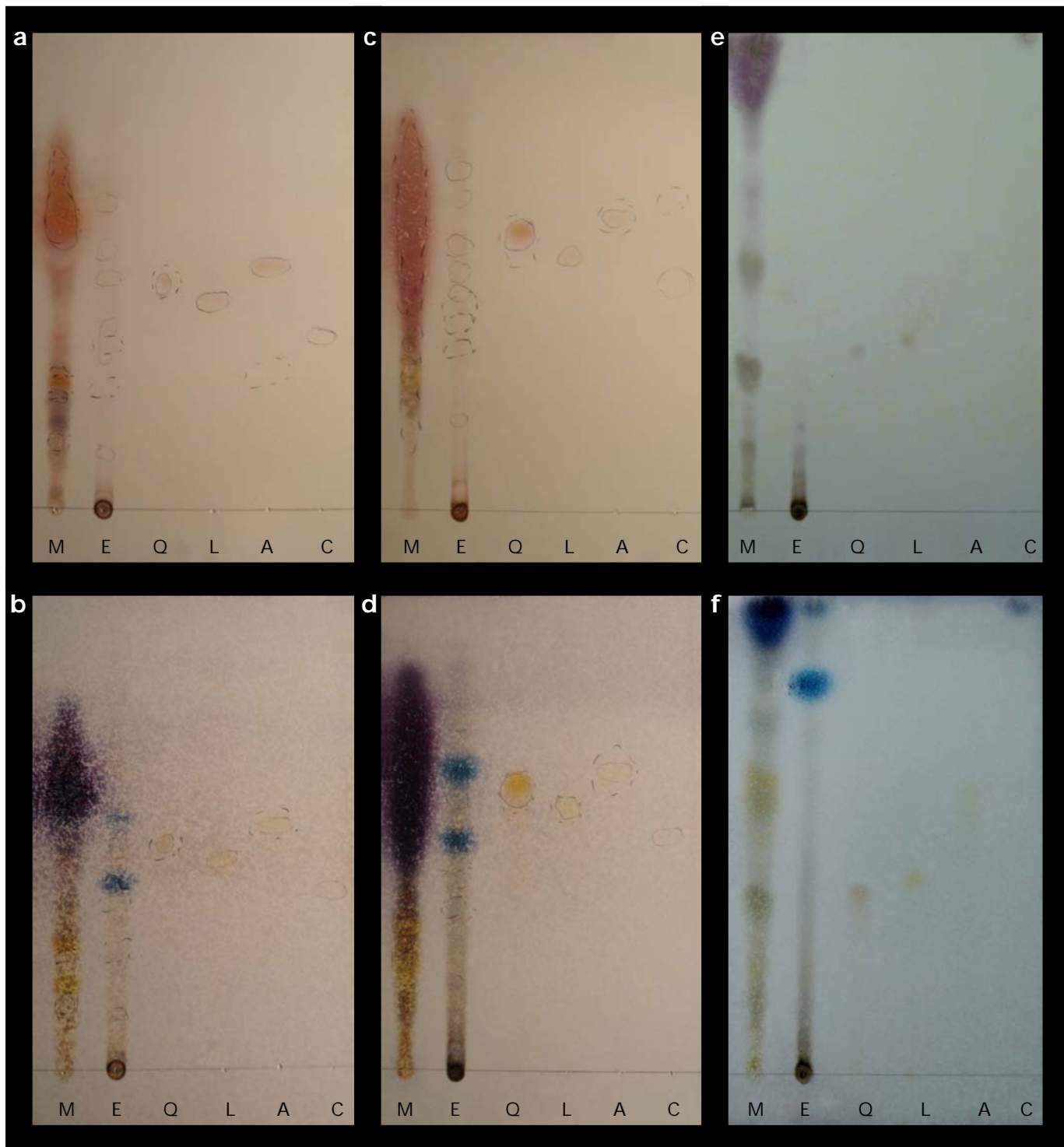
### Fase Móvil

Al obtener las fracciones metanólica y etanólica, a partir del maceramiento con HCl 2M, se realizaron diversas pruebas para determinar la fase móvil para CCF, con la finalidad de obtener una separación adecuada de los compuestos presentes en las fracciones, así como la elución diferencial de las referencias, de esta forma se evaluaron distintas mezclas. El proceso anterior nos permitió seleccionar a la mezcla cloroformo : metanol (8:2) para realizar el análisis cromatográfico de *D. brevis* y *D. tenuicaulis*, y descartar 9 mezclas (figuras 18 y 19):

1. tolueno : cloroformo : acetona, 8:5:7
2. tolueno : acetato de etilo : ácido fórmico, 5:4:1
3. benceno : acetato de etilo, 3:1
4. benceno : acetato de etilo: ácido fórmico, 9:7:4
5. benceno : acetato de etilo : ácido fórmico, 9:7:3
6. benceno : piridina : ácido fórmico, 36:9:5
7. cloroformo : ácido acético : agua, 90:45:6
8. cloroformo : ácido acético : agua, 90:45:4
9. cloroformo : hexano, 95:5



**Figura 18.** Placas cromatográficas (CCF) de las fracciones metanólica (M) y etanólica (E), y dos referencias: quercetina (Q) y luteolina (L), con diferentes fases móviles: **a y b)** benceno:acetato de etilo: ácido fórmico (9:7:4), **c y d)** benceno:piridina:ácido fórmico (36:9:5), **e y f)** cloroformo:ácido acético:agua (90:45:6). Los cromatogramas a, c y e fueron revelados con sulfato cérico, b, d y f se revelaron con vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

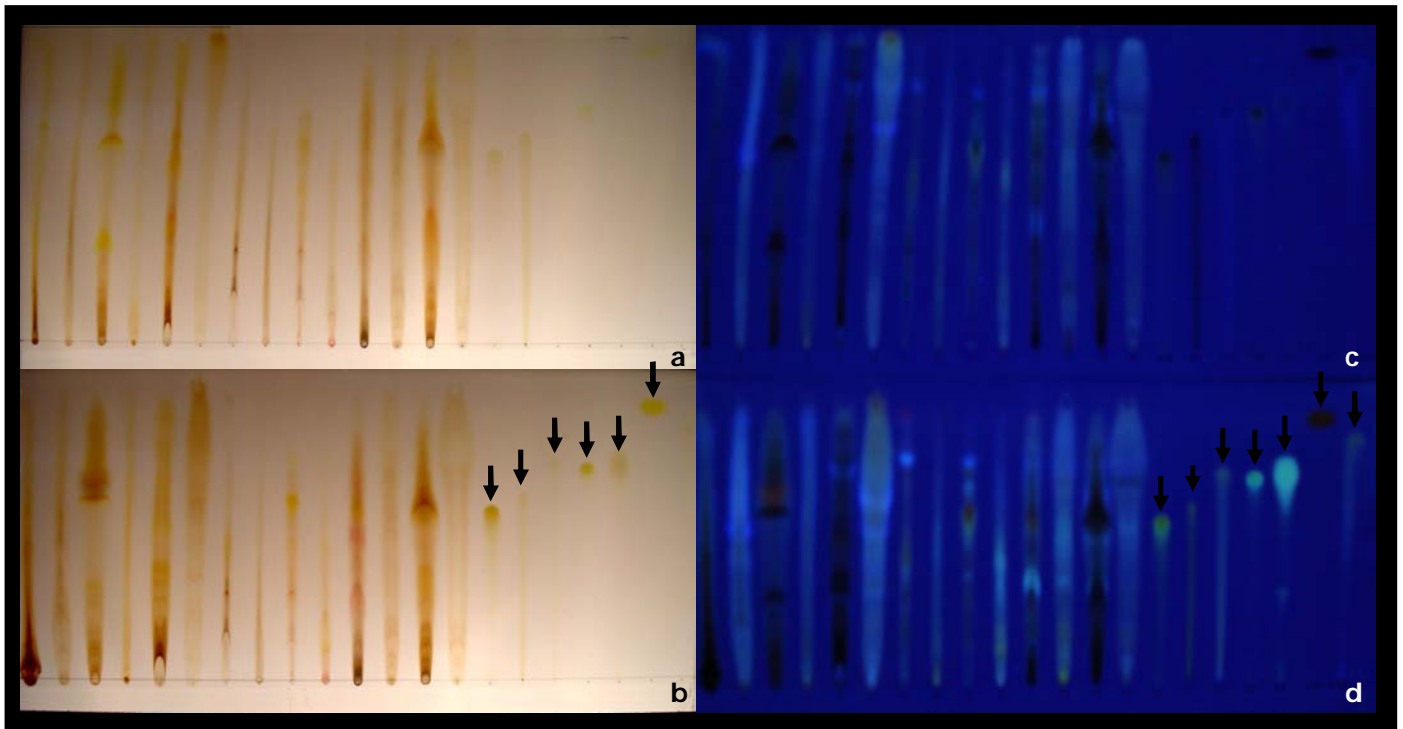


**Figura 19.** Placas cromatográficas (CCF) de las fracciones metanólica (M) y etanólica (E), y 4 referencias: quercetina (Q), luteolina (L), arginina (A) y camperol (C), con diferentes fases móviles: **a y b)** tolueno : acetato de etilo : ácido fórmico (5:4:1), **c y d)** benceno : acetato de etilo : ácido fórmico (9:7:3), **e y f)** cloroformo : ácido acético : agua (90:45:4). Los cromatogramas a,c y e fueron revelados con sulfato cérico, b,d y f se revelaron con vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



## Revelado

Se evaluó el revelado de las placas mediante la aplicación de sulfato cérico y vainillina- $H_2SO_4$  (figuras 18 y 19) con el objetivo de optimizar el análisis. No obstante dichas soluciones mostraron poca exactitud, por lo cual se realizó una prueba con tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) la cual demostró tener mayor especificidad, pues a pesar de revelar diversos compuestos, únicamente los flavonoides se tornan de color amarillo a luz visible, y en luz UV de onda larga (365 nm) se hacen evidentes mediante un cambio intenso de fluorescencia (figura 20).



**Figura 20.** En **a** y **b** se observan los cromatogramas sin aplicar compuestos reveladores, mientras que en **c** y **d** se observa un cambio contundente en las cromatografías debido a la aplicación de  $AlCl_3$ , pues en luz visible (**a** y **c**) los flavonoides (flechas) se tornan de color amarillo y al colocarse bajo luz UV (**b** y **d**, 365 nm) se intensifica su fluorescencia.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivo *in vitro*

#### Evaluación del efecto hormonal sobre el crecimiento de las regiones apicales

Al evaluar el crecimiento de las regiones apicales de *D. tenuicaulis* (figuras 21a y b), es decir la longitud de éstas y el número de nudos generados en cada periodo de tiempo (15, 30, 45 y 60 días), se observó que todos los tratamientos tuvieron la misma tendencia de crecimiento, siendo consistentes los datos de ambos parámetros. Durante los primeros 45 días no se presentaron diferencias significativas en el crecimiento en longitud, sin embargo, son los tratamientos 1 (T1) y 6 (T6), es decir, aquellos que no poseían citocininas, los cuales presentaron mayor crecimiento ( $p < 0.05$ ) después de 60 días de cultivo (tabla 12a), lo anterior indica que ambas hormonas, tanto la bencil adenina (BA) como la cinetina (Kin), y en cualquiera de sus concentraciones, ejercen una actividad inhibitoria en el crecimiento en longitud de los brotes, pues disminuyen la dominancia apical y la producción y actividad de las auxinas que promueven el crecimiento del eje principal (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003). Esta actividad de las citocininas fue lenta, pues es sólo después del subcultivo al medio libre de hormonas, cuando el efecto se presentó, indicando además que la concentración endógena de auxinas no fue capaz de contrarrestar la actividad inhibitoria de las citocininas, pues los niveles, y por lo tanto, su actividad, se correlacionan inversamente (Woodward y Bartel, 2005).

En *D. brevis*, por el contrario, las diferencias se presentaron rápidamente, después de 15 días de cultivo (figura 22a), siendo también T1 y T6 los que en un inicio presentaron los valores más altos (tabla 13a). No obstante, después 45 días,

es decir, cuando los brotes ya habían sido subcultivados a medio basal, fue T4 (Kin 0.5 mg/l) el que elevó su crecimiento sobre el resto de los tratamientos, revelando que la inducción hormonal por citocininas retrasó inicialmente el crecimiento de las regiones apicales, a diferencia de los tratamientos cuya única fuente de fitorreguladores fue interna (T1 y T6), sin embargo, la cinetina en una concentración de 0.5 mg/l y únicamente después de realizarse el subcultivo, es decir, al eliminar su aplicación externa, fue capaz de ejercer una actividad inductora en el crecimiento en longitud, siendo ésta la concentración adecuada que le permitió crear un balance con las auxinas internas, al mantener el tamaño adecuado del meristemo apical, y así, el crecimiento en longitud del tallo debido a la regulación positiva que ejerce sobre el ciclo celular (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003).

En cuanto a la formación de nudos fueron los tratamientos 5 y 10, ambos con Kin 1 mg/l, los que presentaron, en un inicio, los valores más altos ( $p < 0.05$ ) para las regiones apicales cultivadas de *D. tenuicaulis* (figura 21b), ambos poseen la mayor concentración de Kin, evidenciando entonces que fue dicha citocinina la que promovió la mayor formación de nudos, efecto que se atenuó paulatinamente, lo cual pudo deberse a la eliminación de las hormonas en el medio (tabla 12b).

Lo anterior fue contrastante con el comportamiento de *D. brevis* (figura 22b), pues a pesar de ser T1 el que desarrolló la mayor cantidad de nudos después de 30 días de cultivo, es T4 (Kin 0.5 mg/l) quien superó su valor después de 60 días de cultivo (tabla 13b). De esta forma, se sugiere que el subcultivo, y por lo tanto la eliminación de la fuente exógena de Kin, acelera la formación de nudos debido a la disminución en la concentración endógena (tabla 13b).

De esta forma, es evidente la diferencia de las respuestas que presentaron las regiones apicales cultivadas de ambas especies. En *D. tenuicaulis* las

citocininas inhibieron el crecimiento en longitud de los brotes, sin embargo las altas concentraciones de Kin (1 mg/l) promovieron la formación de nudos, indicando que la mayor longitud alcanzada por los brotes cultivados en medio basal está dada por la elongación del tallo y no por la formación de nuevos nudos. En *D. brevis*, por el contrario, la presencia de Kin en baja concentración (0.5 mg/l), y sólo después del subcultivo, promovió el crecimiento en longitud de las regiones apicales y la mayor formación de nudos, por lo cual, es esta característica la que influenció el crecimiento de los brotes y no la elongación del tallo, como en *D. tenuicaulis*. La formación de nudos en regiones apicales cultivadas *in vitro*, inducida por la presencia de citocininas, específicamente Kin, es una respuesta que no ha sido descrita en la literatura consultada.

Al hacer un análisis de la cantidad de brotes formados después de 15 días en *D. tenuicaulis*, se encontraron diferencias significativas de los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/l) y 3 (BA 1 mg/l) comparados con el resto de éstos, lo anterior indica que la hormona BA promovió la activación de las yemas axilares más rápido que la cinetina, y por lo tanto su presencia indujo la formación de una mayor cantidad de brotes (tabla 12c). Es importante hacer notar que los tratamientos sin hormonas, T1 y T6 (medio basal), fueron los que formaron la menor cantidad de brotes, esto indica que la actividad de las regiones apicales cultivadas en estos tratamientos se enfocó en el crecimiento del eje principal y no en la formación de nuevas ramas (tabla 12c, figura 21c), respuesta esperada, ya que *D. tenuicaulis*, al presentar un hábito de crecimiento arborescente, presenta este tipo de desarrollo en su estado silvestre. Además, al estar ausente la aplicación externa de citocininas, en estos tratamientos, la generación de auxinas en el ápice, mantuvo la dominancia apical e inhibió la ramificación al conservar la dormancia de las yemas axilares (Pasternak *et al.*, 2005). Así, en T2 y T3, esta dormancia se rompió, siendo BA la responsable de la generación de los brotes (Kakimoto, 2003).

En *D. brevis* no se observó un patrón claro en la formación de brotes (tabla 13c), sin embargo es notable que T4 (Kin 0.5 mg/l) es uno de los tratamientos que formó la menor cantidad de éstos, pero posee la mayor longitud, mostrando también mayor actividad en el crecimiento del eje principal por actividad del meristemo apical (figura 22c; Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003). T1, que no posee hormonas, formó la mayor cantidad de brotes después de 60 días de cultivo, así como aquellos tratamientos en donde la inducción hormonal se mantuvo durante 30 días (T7, T8, T9 y T10), indicando que en *D. brevis*, la presencia de hormonas que disminuyen su concentración debido al subcultivo posterior a 15 días de cultivo, inhibió la formación de brotes. La homogeneidad, por lo tanto, presentada entre los tratamientos de *D. brevis*, es una clara evidencia del hábito herbáceo que esta presenta, desarrollando una ramificación constante desde etapas tempranas de su desarrollo.

Cuando comparamos además, la generación de dichos brotes respecto a su posición, se observó que en *D. tenuicaulis* había una diferencia muy marcada ( $p < 0.05$ ), habiendo mayor producción de éstos en el primer nudo adyacente a la zona de corte ( $1.2973 \pm 0.88$ ), mientras que en aquellos nudos cercanos al ápice, la brotación fue mucho menor ( $0.2703 \pm 0.65$ ). En *D. brevis* no hubo ninguna diferencia significativa, mostrando una brotación homogénea en todos los nudos sin haber relación con la posición de éstos respecto al ápice.

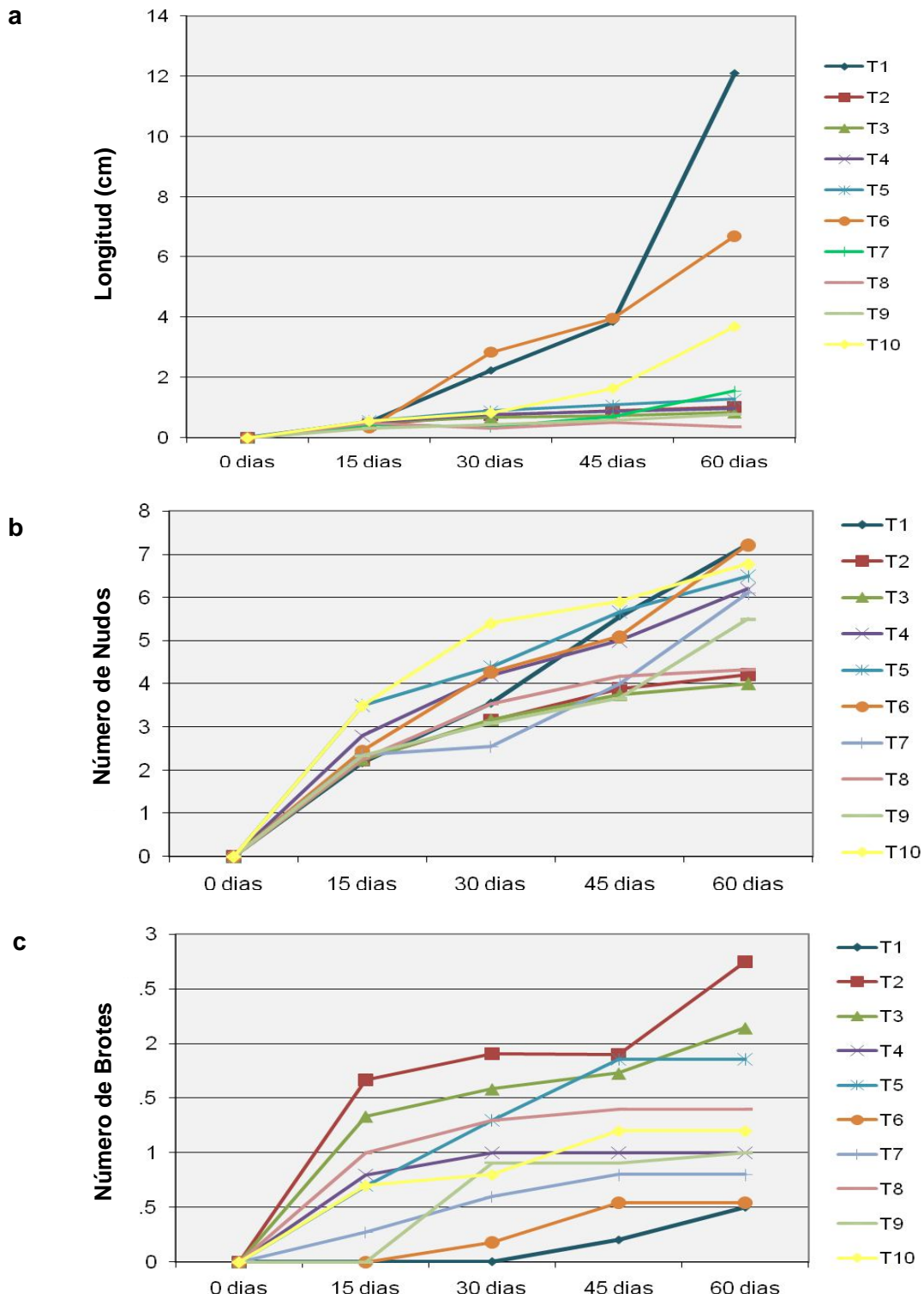
Los resultados observados en *D. tenuicaulis* pueden explicarse debido al fenómeno de dominancia apical, ya que los nudos más alejados están bajo menor influencia de las hormonas generadas en la región apical (auxinas), mostrando mayor influencia de la citocininas endógenas y exógenas que activan las yemas axilares en los nudos basales respecto a aquellos nudos cercanos al ápice (Kakimoto, 2003). Por otro lado, la ausencia de un patrón claro en la formación de brotes de *D. brevis* de acuerdo a la hormona aplicada y la posición de los nudos

respecto al ápice, pudo ser producto también de la independencia que esta planta ha adquirido ante la presencia de reguladores de crecimiento después de haber permanecido durante un largo periodo de tiempo bajo condiciones *in vitro* y la continua inducción hormonal a la que dichas plantas ha, sido sometidas. En este ámbito, es imprescindible contemplar, que cada planta, órgano, tejido y/o célula cultivada, posee una "historia hormonal" de acuerdo al sistema vegetal al que pertenecieron, así como la interacción que dichas hormonas endógenas tienen con los reguladores de crecimiento aplicados (Cline, 1976).

Al hacer un análisis de correlación (correlación bilateral de Pearson) después de 15 y 60 días de cultivo, se encontró una asociación entre los datos obtenidos para el crecimiento en longitud y la cantidad de nudos formados en los brotes ( $p < 0.05$ ), la correlación fue positiva en ambas especies, es decir, conforme aumenta la longitud del tallo, aumenta el número de nudos también (tablas 13 y 14). Dicha correspondencia y se hizo evidente desde los primeros 15 días (figura 23a y 24a), intensificándose después de 60 días de cultivo (figura 23b y 24b).

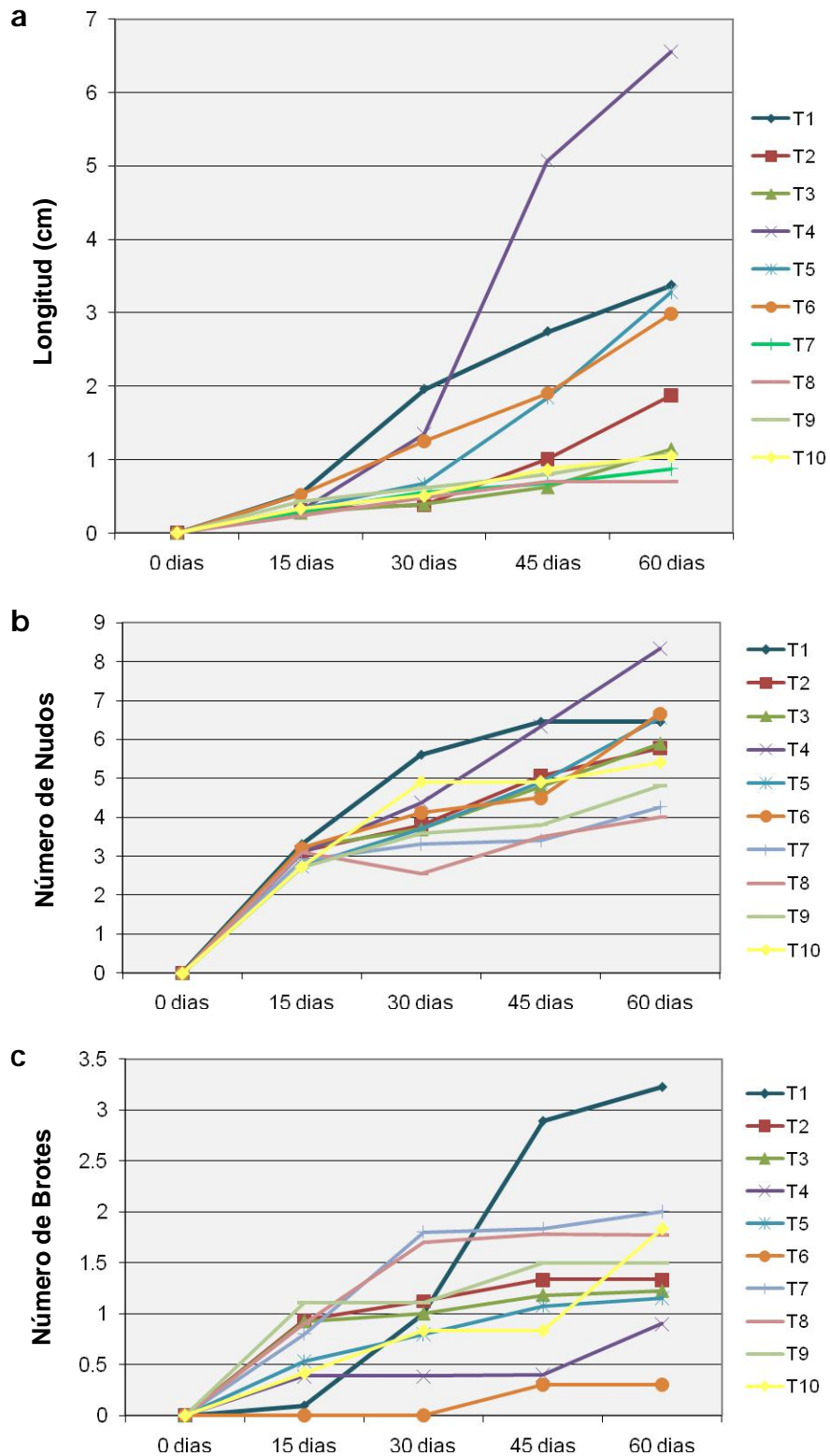
Cuando analizamos la correlación (correlación bilateral de Pearson) existente entre la longitud de los brotes y la cantidad de brotes axilares formados, fue clara la correspondencia negativa de los datos, de forma que conforme la longitud de los brotes es mayor, la cantidad de brotes generados disminuye, lo cual indica que la actividad de las citocininas, es capaz de inducir una mayor formación de brotes sacrificando el crecimiento del eje principal, lo cual a su vez es congruente con los resultados obtenidos en estos dos parámetros descritos anteriormente, pues aquellos tratamientos cuya longitud fue mayor, generaron una menor cantidad de brotes, mientras que aquellos tratamientos con una longitud menor, formaron más brotes. En *D. tenuicaulis*, la correlación se presentó después de 60 días ( $p < 0.05$ , figura 25a y b, tabla 15), mientras que en *D. brevis* sólo durante los primeros días de cultivo (figura 26a y b, tabla 16), demostrando así que en *D.*

*brevis* el primer periodo de inducción fue el que tuvo mayor efecto sobre dicha correspondencia, eliminando el efecto cuando las hormonas se eliminaron también, mientras que el *D. tenuicaulis* fue necesaria la exclusión de las hormonas exógenas, evento que no permitió la continua asimilación y disminuyó su concentración interna, permitiendo llegar a la concentración exacta que indujo la ramificación de los brotes.



**Figura 21.** Curvas de crecimiento de las regiones apicales de *D. tenuicaulis*: **a)** longitud, **b)** número de nudos y **c)** número de brotes. Todos los tratamientos mantienen la misma tendencia, sin embargo T1 y T6 son los que poseen el mayor crecimiento en longitud y la menor formación de brotes después de 60 días de cultivo, mientras que T5 y T10 forman, en un inicio, una mayor cantidad de nudos. T2 y T3 generan más brotes al inicio del cultivo, efecto que paulatinamente se atenúa. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.





**Figura 22.** Curvas de crecimiento de las regiones apicales de *D. brevis*: **a)** longitud, **b)** número de nudos y **c)** número de brotes. Todos los tratamientos mantienen la misma tendencia, sin embargo, en un inicio, T1 y T6 son los que poseen el mayor crecimiento en longitud y cantidad de nudos, siendo superados por T4 después de 45 días de cultivo, tratamiento que a su vez, forma pocos brotes a diferencia de T1. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

**Tabla 12.** Promedios de crecimiento de las regiones apicales de *D. tenuicaulis* para los tratamientos en cada periodo de tiempo. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el parámetro de crecimiento evaluado ( $p < 0.05$ ), **a** representando a los valores mayores y **c** a los menores. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

a) Longitud del Brote								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	0.52 ± 0.26	a	2.22 ± 2.98	a	3.84 ± 3.7	a	12.1 ± 10.52	a
2	0.44 ± 0.3	a	0.75 ± 0.37	a	0.9 ± 0.47	a	1.03 ± 0.48	b
3	0.49 ± 0.13	a	0.68 ± 0.33	a	0.71 ± 0.34	a	0.84 ± 0.46	b
4	0.5 ± 0.33	a	0.76 ± 0.3	a	0.86 ± 0.33	a	0.96 ± 0.46	b
5	0.56 ± 0.24	a	0.89 ± 0.43	a	1.08 ± 0.3	a	1.28 ± 0.51	b
6	0.35 ± 0.27	a	2.85 ± 4.58	a	3.97 ± 6	a	6.7 ± 8.96	a
7	0.45 ± 0.31	a	0.37 ± 0.36	a	0.7 ± 0.6	a	1.55 ± 2.04	b
8	0.49 ± 0.14	a	0.32 ± 0.3	a	0.52 ± 0.37	a	0.37 ± 0.15	b
9	0.32 ± 0.11	a	0.44 ± 0.28	a	0.59 ± 0.26	a	0.77 ± 0.32	b
10	0.56 ± 0.24	a	0.83 ± 0.41	a	1.64 ± 1.01	a	3.68 ± 2.4	b

b) Número de Nudos								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	2.17 ± 0.94	b	3.55 ± 1.04	b,c	0.57 ± 0.98	a,b	7.25 ± 1.5	a
2	2.25 ± 0.75	b	3.17 ± 1.19	b,c	3.9 ± 1.2	a,b	4.22 ± 1.56	a,b
3	2.25 ± 0.45	b	3.17 ± .84	b,c	3.75 ± 0.97	b	4 ± 0.93	b
4	2.8 ± 0.92	a,b	4.2 ± 1.32	a,b,c	5 ± 1.77	a,b	6.2 ± 2.39	a,b
5	3.5 ± 0.97	a	4.4 ± 1.65	a,b	5.67 ± 1.5	a,b	6.5 ± 1.73	a,b
6	2.46 ± 0.52	a,b	4.27 ± 1.42	a,b	5.09 ± 1.3	a,b	7.22 ± 2.49	a
7	2.36 ± 0.67	b	2.55 ± 0.69	c	4 ± 1.25	a,b	6.1 ± 2.03	a,b
8	2.27 ± 0.47	b	3.55 ± 1.29	b,c	4.18 ± 1.33	a,b	4.33 ± 1.03	a,b
9	2.33 ± 0.71	b	3.09 ± 1.22	a,b	3.67 ± 1.32	b	5.5 ± 1.07	a,b
10	5.4 ± 0.97	a	5.4 ± 1.17	b,c	5.9 ± 1.45	a	6.78 ± 1.86	a,b

c) Número de Brotes Axilares								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	0 ± 0	b	1.66 ± 0.58	b	0.2 ± 0.63	b	0.5 ± 1	b
2	1.67 ± 1.07	a	1.91 ± 0.94	a	1.9 ± 0.99	a	2.75 ± 1.04	a
3	1.33 ± 1.3	a	1.58 ± 1.31	a	1.73 ± 1.27	a,b	2.14 ± 1.22	a,b
4	0.8 ± 0.79	a,b	1 ± 0.82	a,b	1 ± 0.82	a,b	1 ± 0.82	a,b
5	0.7 ± 0.68	a,b	1.3 ± 1.57	a,b	1.86 ± 1.68	a	1.86 ± 1.68	a,b
6	0 ± 0	b	0.18 ± 0.6	B	0.55 ± 1.29	a,b	0.55 ± 1.29	b
7	0.27 ± 0.65	b	0.6 ± 0.97	a,b	0.8 ± 1.03	a,b	0.8 ± 1.03	b
8	1 ± 1	a,b	1.3 ± 0.95	a,b	1.4 ± 0.97	a,b	1.4 ± 0.97	a,b
9	0 ± 0	b	0.91 ± 0.94	a,b	0.91 ± 0.94	a,b	1 ± 1	a,b
10	0.7 ± 0.68	a,b	0.8 ± 0.63	a,b	1.2 ± 0.79	a	1.2 ± 0.79	a,b

**Tabla 13.** Promedios de crecimiento de las regiones apicales de *D. brevis* para los tratamientos en cada periodo de tiempo. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el parámetro de crecimiento evaluado ( $p < 0.05$ ), **a** representando a los valores mayores y **c** a los menores. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

<b>a) Longitud del Brote</b>								
<b>Tratamiento</b>	<b>Intervalo de Tiempo</b>							
	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	<b>60 días</b>				
<b>1</b>	0.54 ± 0.29	a	1.96 ± 1.41	a	2.74 ± 1.66	a,b	3.38 ± 2.02	a,b
<b>2</b>	0.31 ± 0.12	a,b	0.38 ± 0.16	d	1 ± 1.16	b	1.87 ± 2.72	b
<b>3</b>	0.28 ± 0.2	a,b	0.39 ± 0.17	d	0.62 ± 0.26	b	0.14 ± 1.01	b
<b>4</b>	0.31 ± 0.1	a,b	1.35 ± 1.05	a,b	5.07 ± 3.41	a	6.56 ± 4.3	a
<b>5</b>	0.33 ± 0.26	a,b	0.67 ± 0.41	b,c,d	1.84 ± 1.91	b	3.28 ± 3.79	a,b
<b>6</b>	0.52 ± 0.2	a	1.25 ± 0.76	a,b,c	1.9 ± 1.28	b	2.98 ± 2.2	a,b
<b>7</b>	0.3 ± 0.12	a,b	0.356 ± 0.14	b,c,d	0.68 ± 0.21	b	0.87 ± 0.26	b
<b>8</b>	0.23 ± 0.18	b	0.48 ± 0.16	c,d	0.37 ± 0.1	b	0.65 ± 0.05	b
<b>9</b>	0.43 ± 0.21	a,b	0.61 ± 0.3	b,c,d	0.8 ± 0.23	b	1.08 ± 0.25	b
<b>10</b>	0.33 ± 0.26	a,b	0.51 ± 0.16	a	0.87 ± 0.28	b	1.05 ± 0.31	b

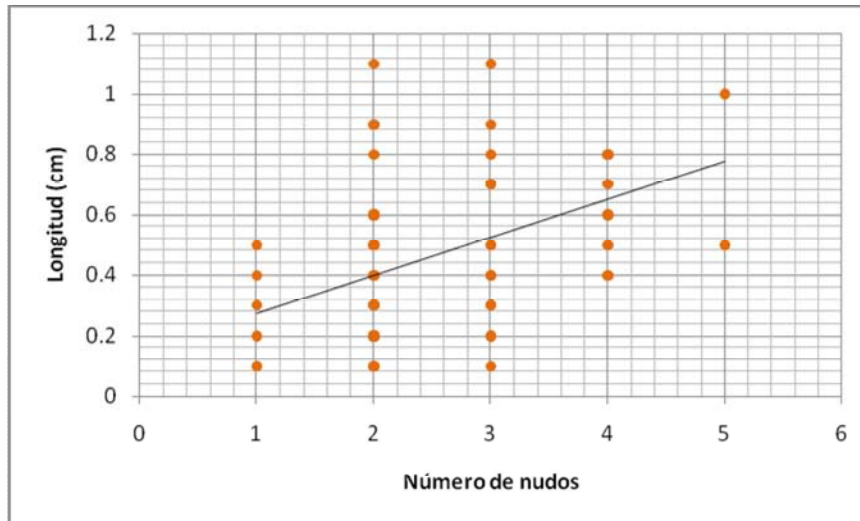
  

<b>b) Número de Nudos</b>								
<b>Tratamiento</b>	<b>Intervalo de Tiempo</b>							
	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	<b>60 días</b>				
<b>1</b>	3.3 ± 0.68	a	5.6 ± 2.12	a	6.44 ± 2.65	a	6.44 ± 2.65	a,b
<b>2</b>	3.13 ± 0.89	a	3.9 ± 1.05	b,c,d	5.07 ± 1.27	a,b,c	5.79 ± 1.48	a,b
<b>3</b>	3.23 ± 0.6	a	3.69 ± 1.03	b,c,d	4.78 ± 1.3	a,b,c	5.89 ± 1.62	a,b
<b>4</b>	3.08 ± 1.12	a	4.38 ± 1.33	a,b,c	6.33 ± 1.94	a,b	8.33 ± 1.8	a
<b>5</b>	3.73 ± 0.88	a	3.69 ± 0.75	b,c,d	4.89 ± 1.17	a,b,c	6.56 ± 1.8	a,b
<b>6</b>	3.22 ± 0.44	a	4.13 ± 0.84	a,b,c	4.5 ± 0.84	a,b,c	6.67 ± 1.03	a,b
<b>7</b>	2.9 ± 0.88	a	3.3 ± 0.68	c,d	3.4 ± 0.89	c	4.25 ± 2.21	b
<b>8</b>	3.1 ± 0.57	a	2.56 ± 0.88	d	3.5 ± 0.5	c	4 ± 1	b
<b>9</b>	2.71 ± 0.49	a	3.57 ± 0.54	b,c,d	3.8 ± 0.84	b,c	4.8 ± 0.45	b
<b>10</b>	2.73 ± 0.88	a	4.92 ± 0.79	a,b	4.92 ± 0.9	a,b,c	5.42 ± 1	a,b

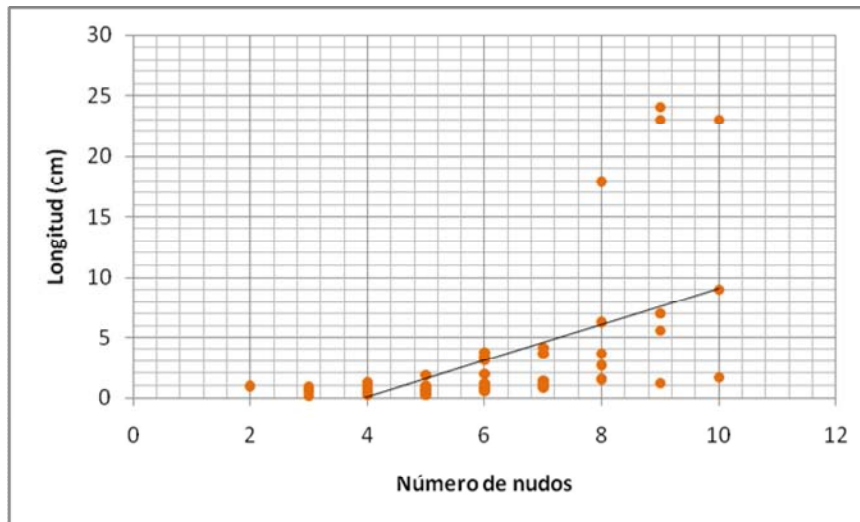
  

<b>c) Número de Brotes Axilares</b>								
<b>Tratamiento</b>	<b>Intervalo de Tiempo</b>							
	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	<b>60 días</b>				
<b>1</b>	0.1 ± 0.32	a,b	1 ± 1.49	a,b	2.89 ± 1.45	a	3.22 ± 1.72	a
<b>2</b>	0.94 ± 0.85	a,b	1.13 ± 0.81	a,b	1.33 ± 1.05	b,c	1.33 ± 1.04	a,b
<b>3</b>	0.92 ± 0.95	a,b	1 ± 1	a,b	1.18 ± 1.25	b,c	1.22 ± 1.56	b
<b>4</b>	0.39 ± 0.77	a,b	0.39 ± 0.77	b	0.4 ± 0.97	b,c	0.9 ± 1.29	b
<b>5</b>	0.53 ± 0.74	a,b	0.8 ± 0.78	a,b	1.08 ± 1.19	b,c	1.15 ± 1.14	b
<b>6</b>	0 ± 0	b	0 ± 0	b	0.3 ± 0.95	c	0.3 ± 0.95	b
<b>7</b>	0.8 ± 0.92	a,b	1.8 ± 0.42	a	1.83 ± 0.41	a,b	2 ± 0	a,b
<b>8</b>	0.9 ± 0.99	a,b	1.7 ± 0.48	a	1.78 ± 0.44	a,b,c	1.75 ± 0.46	a,b
<b>9</b>	1.11 ± 1.05	a	1.11 ± 1.05	a,b	1.5 ± 0.84	a,b,c	1.5 ± 0.84	a,b
<b>10</b>	0.42 ± 0.52	a,b	0.83 ± 0.72	a,b	0.83 ± 0.72	b,c	1.83 ± 1.95	a,b

a



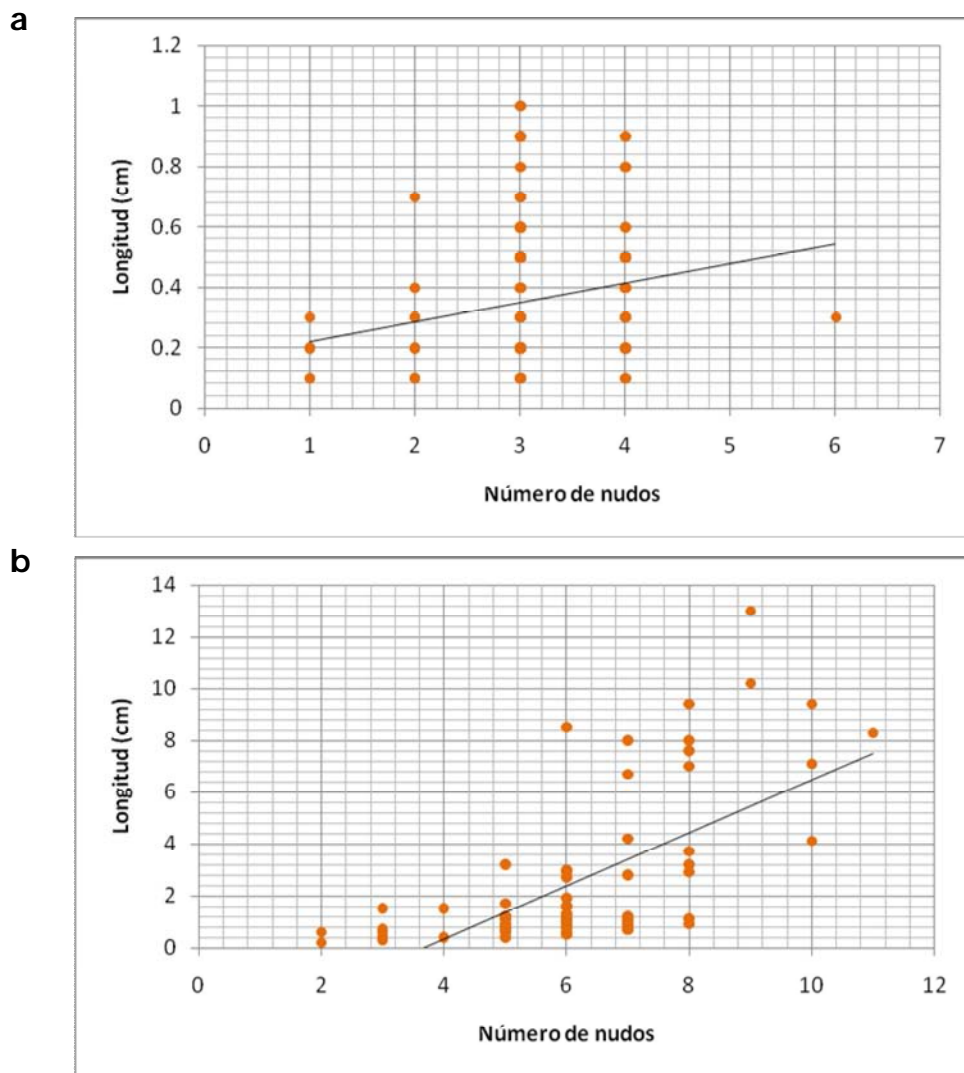
b



**Figura 23.** Gráficas de regresión lineal de la longitud de los brotes de *D. tenuicaulis* comparada con el número de nudos que éstos generan, después de 15 (a) y 60 días (b) de cultivo. En ambas se observa una correlación positiva.

**Tabla 14.** Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de nudos de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de *D. tenuicaulis*. A pesar de que la intensidad de la asociación es baja, se observa una asociación positiva que aumenta después de 60 días de cultivo.

<b>Coeficiente de Correlación</b>	<b>15 días</b>	<b>60 días</b>
<b>de Pearson</b>	0.4439	0.5897
<b>Significancia</b>	0	0
<b>N muestral</b>	108	69



**Figura 24.** Gráficas de regresión lineal de la longitud de los brotes de *D. brevis* comparada con el número de nudos que éstos generan, después de 15 (a) y 60 días (b) de cultivo. En ambas se observa una correlación positiva, pero esta se intensifica después de 60 días de cultivo.

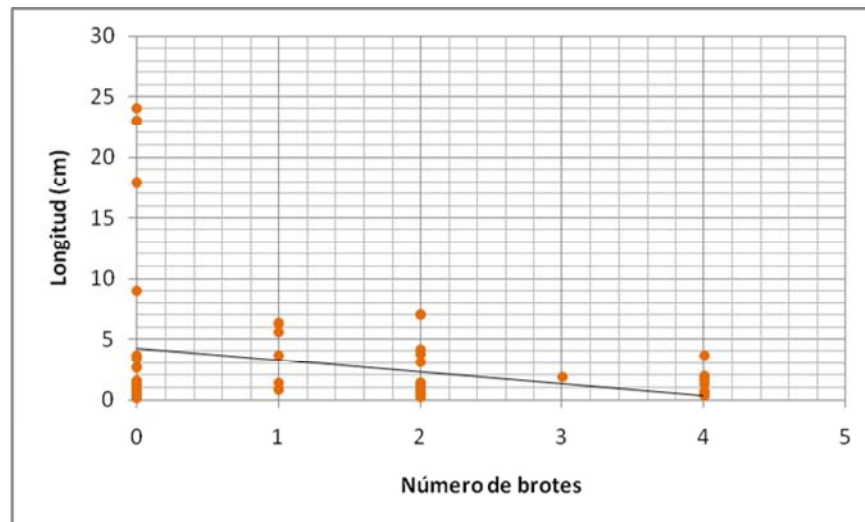
**Tabla 15.** Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de nudos de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de *D. brevis*, observándose una asociación positiva.

Coeficiente de	15 días	60 días
Correlación de Pearson	0.2402	0.6607
Significancia	0.0091	0
N muestral	117	76

a



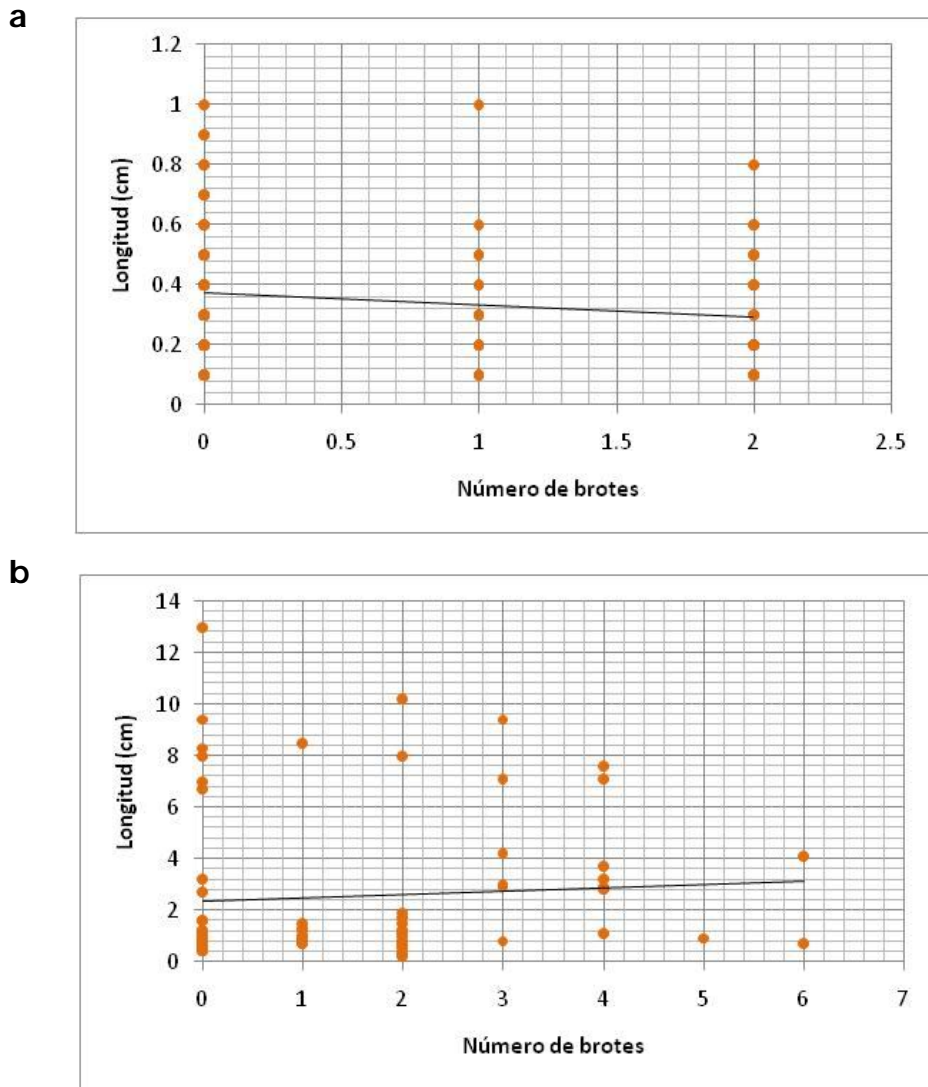
b



**Figura 25.** Gráficas de la regresión lineal de la longitud de los brotes de *D. tenuicaulis* comparadas con el número de brotes axilares que éstas generan, después de 15 (a) y 60 días (b) de cultivo. A pesar de que en el primer periodo de tiempo no hay ninguna asociación entre los datos, después de 60 días de cultivo la correlación es negativa.

**Tabla 16.** Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de brotes axilares de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de *D. tenuicaulis*, observándose una asociación negativa después de 60 días de cultivo.

<b>Coeficiente de Correlación</b>	<b>15 días</b>	<b>60 días</b>
<b>de Pearson</b>	0.1459	-0.2449
<b>Significancia</b>	0.1319	0.0493
<b>N muestral</b>	108	65



**Figura 26.** Gráficas de la regresión lineal de la longitud de los brotes de *D. brevis* comparadas con el número de brotes axilares que éstos generan, después de 15 (a) y 60 días (b) de cultivo. En a hay una correlación negativa, mientras que en b esta se anula.

**Tabla 17.** Coeficiente de correlación entre las variables longitud y número de brotes axilares de los brotes regenerados a partir de regiones apicales de *D. brevis*, observando se una asociación negativa después de 15 días de cultivo, después de lo cual, ésta disminuye hasta desaparecer después de 60 días.

Coeficiente de	15 días	60 días
Correlación de Pearson	-0.157	0.0688
Significancia	0.0909	0.5604
N muestral	117	74

El 21.5% de las regiones apicales sometidas al T1 y el 40 % de las regiones apicales de *D. tenuicaulis* sometidas al T6 formaron de 1 a 2 raíces (figura 28a), aunque ambos tratamientos corresponden a medio basal, la diferencia radica en el tiempo de subcultivo, siendo las plantas de T1 subcultivadas después de 15 días y las de T6 después de 30 días, lo anterior nos indica que la permanencia en el mismo medio de cultivo induce una mayor formación de raíces debido a la disminución constante de los nutrientes en la zona adyacente al explante debido a su absorción por éste, la reducción paulatina de sales y/o carbohidratos ha sido una estrategia ampliamente utilizada para inducir el enraizamiento de cultivos *in vitro*.

La misma respuesta se presentó el 60% de las plantas de *D. brevis* cultivadas en T1 y el 33.33% en T6 (figura 28c), siendo en este caso T1, quien generó una mayor cantidad de raíces, indicando que el subcultivo en un periodo de tiempo corto indujo la organogénesis en esta especie, y que, a diferencia de *D. tenuicaulis*, la renovación del medio, y por lo tanto, el restablecimiento de la concentración de nutrientes, puede inducir la formación de raíces que brinde a la planta una mayor eficiencia en la absorción de los componentes del medio.

En ambas especies, la presencia de las raíces indujo un crecimiento más rápido de los brotes en comparación con aquellos que no las formaron, es decir, aquellas plantas provenientes de los tratamientos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 (figura 28b y d), que contenían citocininas, las cuales inhiben la generación de un sistema radical (George *et al.*, 2008). La parte aérea de las plantas que formaron raíces se diferenció grandemente del resto, pues sólo éstas poseían una coloración verde homogénea (figura 28a y c), a diferencia de los brotes cultivados en un medio adicionado con reguladores de crecimiento, ya que estas últimas presentaron zonas rojizas, en *D. tenuicaulis*, en las regiones apicales, tanto del eje principal, como de los brotes axilares con alta actividad de crecimiento y en las hojas (figura 28b), y en *D. brevis*, a lo largo del todo el tallo (figura 28d). Es probable que este



efecto se deba a la diferencia en la capacidad de absorción, asociándose nuevamente a la disponibilidad de nutrientes, en donde aquellas plantas que no desarrollan un sistema radical que les permita absorber las sales del medio, forman una mayor cantidad de metabolitos secundarios (Inderjit *et al.*, 1994), respuesta antes observada en las plantas cultivadas en el medio adicionado con carbón activado. En *D. tenuicaulis* además, el ensanchamiento de la base del tallo en contacto con el medio fue una constante en los tratamientos con citocininas, en donde finalmente se generó un callo denso y verdoso (figura 28b). La proporción auxinas/citocininas, generadas por el ápice y aplicadas de forma externa respectivamente, promovió la formación del callo (George *et al.*, 2008), fotosintético, puesto que las citocininas intervienen en la formación y maduración de cloroplastos (Hutchinson y Kieber, 2002). Mullin y Schlegel (1978) reportaron la formación de callo en el 81.37% de los meristemas apicales cultivados de *D. pinnata*, en donde, a diferencia de *D. tenuicaulis*, el fitorregulador aplicado fue AIA solo o en combinación con Kin 0.1 mg/l. Así mismo, cultivos de meristemas apicales y yemas axilares de *D. pinnata*, desarrollaron callos en presencia de concentraciones altas de ANA (Wang *et al.*, 1988).

La hiperhidratación de las regiones apicales de *D. tenuicaulis* fue una característica que se presentó en el 10-20% de las cultivadas en tratamientos adicionados con citocininas (figura 27), fitorreguladores que han demostrado tener también este efecto en los brotes (George *et al.*, 2008), y que culminó con la oxidación y muerte de la mayoría de éstos.



**Figura 27.** Brote hiperhidratado de *D. tenuicaulis*.

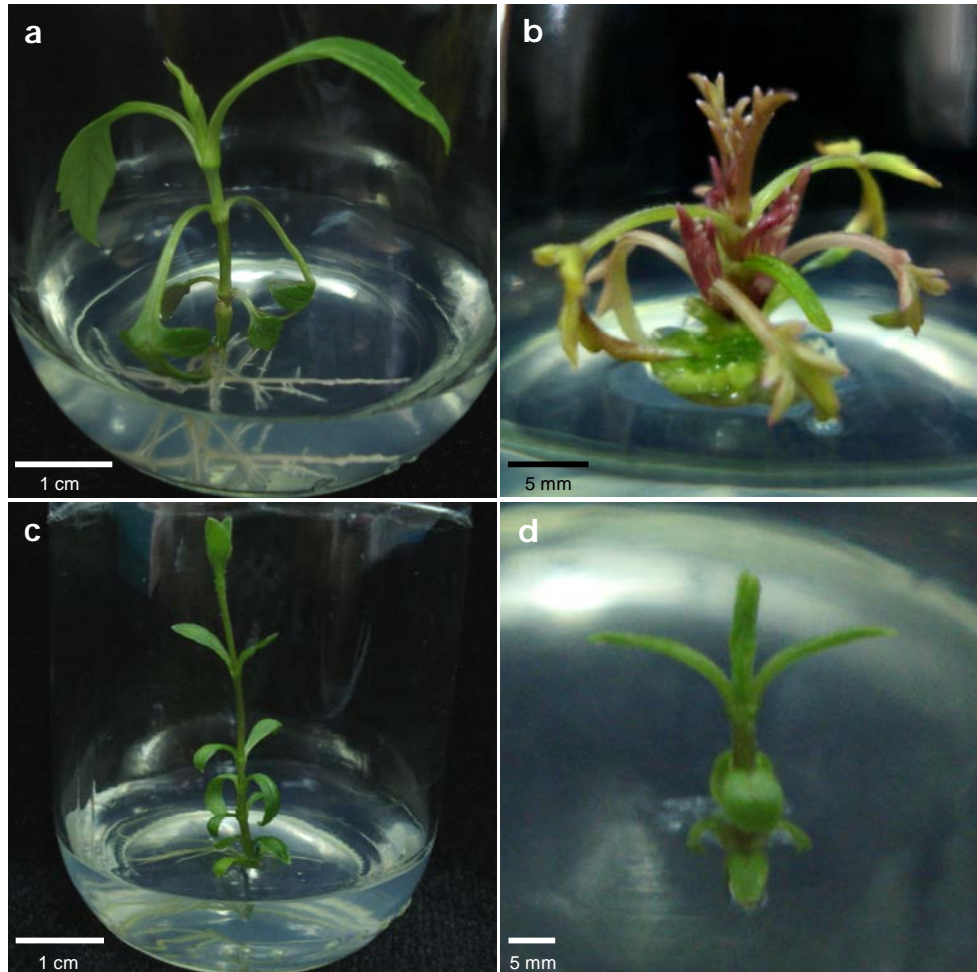
Los brotes regenerados a partir los cultivos *in vitro* de regiones apicales de *D. tenuicaulis*, formaron hojas simples, en algunas ocasiones pinadas con el

margen serrado y con filotaxia opuesta (figura 28a), muy similares a los ejemplares silvestres, aunque estos últimos presentan hojas pinadas o bipinadas y el tallo presenta estrías. Una característica peculiar que se observó en diversos brotes fue la presencia de nudos con tres yemas axilares, la cual no se ha observado en las plantas silvestres de esta especie (Sorensen, 1969).

Las plantas de *D. brevis* cultivadas *in vitro* poseen una mayor variación con respecto a las plantas silvestres en comparación con las de *D. tenuicaulis*, efecto que puede deberse a la variación somaclonal que esta especie ha experimentado durante el largo periodo de cultivo *in vitro* al que ha sido sometida. No obstante debe señalarse que las plantas cultivadas se encuentran en un estado juvenil, mientras que las descripciones de las especies han sido realizadas a partir de individuos adultos. Los brotes obtenidos formaron tallos ligeramente estriados sin tricomas, con hojas glabras en las caras adaxial y abaxial, los márgenes son enteros sin cilios y el peciolo es imperceptible (figura 28c). Se diferencian con los ejemplares silvestres que poseen tallos muy estriados y pubescentes, con hojas ventralmente glabras o escasamente pubescentes, dorsalmente pubescentes, los márgenes son ciliados, enteros o irregularmente serrados y el peciolo de 7–22 mm de longitud (Sorensen, 1969).

La mayoría de los tratados anteriores, en donde se cultivaron regiones apicales de dalias, aplicaron auxinas (AIA, AIB y ANA) y giberelinas ( $GA_3$ ) como reguladores de crecimiento, en este estudio, se aplicaron citocininas con la finalidad de comparar los resultados, además de ser recomendables para tener éxito en la etapa II de la micropropagación (George *et al.*, 2008). En estos estudios, se obtuvieron plantas muy pequeñas (Morel y Martin, 1952; Mullin y Schlegel, 1978; Wei *et al.*, 1990, citado en González, 1999) con una longitud máxima promedio de 2.8 cm (Hernández, 1993), y a pesar de que se ha podido establecer una relación en la concentración de auxinas y la longitud de los brotes

en dichos trabajos, en este estudio se obtuvieron plantas con una mayor longitud, aun en las regiones apicales cultivadas con citocininas.



**Figura 28.** Plantas y brotes regenerados a partir de ápices. **a y b)** *D. tenuicaulis*, **c y d)** *D. brevis*. T1 y T6 formaron un sistema radical (**a y c**), las plantas tienen mayor longitud y una coloración verde homogénea, mientras que las regiones apicales cultivadas con citocininas no formaron raíces (**b y d**) y presentan una coloración rojiza.

Los primeros cultivos *in vitro* de ápices de dalias (Morel y Martin, 1952; Mullin y Schlegel, 1978) lograron una sobrevivencia muy baja, especialmente en las especies arborescentes, en donde se ha especificado la necrosis de los explantes como resultado del alto porcentaje de oxidación (80%), a pesar de haber aplicado una solución de diversos antioxidantes anterior a la siembra y carbón activado en el medio de cultivo (González, 1999). La aplicación de PVP en el medio

de cultivo, logró evitar dicho problema en los cultivos de ápices, presentándose este efecto sólo en el 1% de los explantes de *D. tenuicaulis* y 0% de *D. brevis*.

Hernández (1993) estableció una relación directamente proporcional entre la concentración de BA y la pigmentación que presentaron los ápices debido a la formación de antocianinas, lo cual puede explicar los resultados aquí descritos, pues la presencia de citocininas generó también una pigmentación rojiza en los explantes, y ha sido reportado que las citocininas intervienen directamente en la producción de antocianinas (Hutchinson y Kieber, 2002).

La formación de raíces sin aplicación de fitorreguladores no ha sido reportada anteriormente, siendo este el primer estudio en donde se presenta el enraizamiento espontáneo de brotes de dalias, arborescentes y herbáceas.

## **Evaluación del efecto hormonas sobre la activación de yemas axilares y crecimiento de los brotes**

Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos a partir de los nudos cultivados de *D. tenuicaulis*, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p < 0.05$ , tabla 18a), de esta forma, el crecimiento de los brotes a partir de las yemas axilares de los nudos fue mayor en los tratamientos 4 y 5 (figura 29a), es decir aquellos que poseen cinetina, indicando que dicha citocinina, en cualquiera de las dos concentraciones aplicadas (0.5 y 1 mg/l) ejerció una mayor influencia en la brotación, ya que activa las yemas axilares en dormancia (Kakimoto, 2003). Posteriormente, y en combinación con las auxinas endógenas, fue capaz de promover eficientemente el crecimiento de los brotes, a diferencia de aquellos tratamientos en donde no hay hormonas (T1 y T6), pues las citocininas son esenciales para lograr la elongación de los entrenudos (Kakimoto, 2003). El crecimiento, sin embargo, se hizo homogéneo después de 30 días (figura 29a, tabla 18a), lo cual puede ser producto de la inducción hormonal ejercida sólo durante el primer periodo, y que después del subcultivo a medio basal, el efecto de las hormonas sobre el crecimiento en longitud de los brotes disminuyó drásticamente.

Al evaluar la curva (figura 30a) y el análisis estadístico (tabla 19a) del crecimiento en longitud de los brotes originados a partir del cultivo de nudos de *D. brevis*, encontramos una respuesta disímil en comparación con el comportamiento que presentan los nudos de *D. tenuicaulis*, ya que se observó un patrón de crecimiento periódico y semejante en todos los tratamientos: mientras que en el periodo de 15 días hay una homogeneidad ( $p > 0.05$ , tabla 19a), después de 30 días de cultivo encontramos diferencias significativas entre dichos tratamientos ( $p < 0.05$ ), después de 45 días de cultivo, encontramos nuevamente una homogeneidad en las longitudes alcanzadas, la cual se rompió posteriormente, después de 60 días de cultivo. Este patrón de crecimiento puede

deberse a que a pesar de que las hormonas influenciaron el crecimiento diferencial de los brotes reflejado en la longitud de éstos, la temporalidad en la que los reguladores de crecimiento actúan, en *D. brevis*, está asociada principalmente a un control interno. T7 fue el que promovió el mayor crecimiento en longitud después de 30 días de cultivo, por lo que la BA en concentraciones bajas (0.5 mg/l) debió de acelerar este proceso después del primer periodo de inducción, creando el balance auxina/citocinina necesario para la elongación de los brotes (Kakimoto, 2003). A pesar de esto, los brotes generados en T6 lograron un mayor crecimiento después de 60 días (tabla 19a), lo anterior puede estar influenciado por el subcultivo reciente de éstas a un medio de cultivo cuyos componentes han sido renovados.

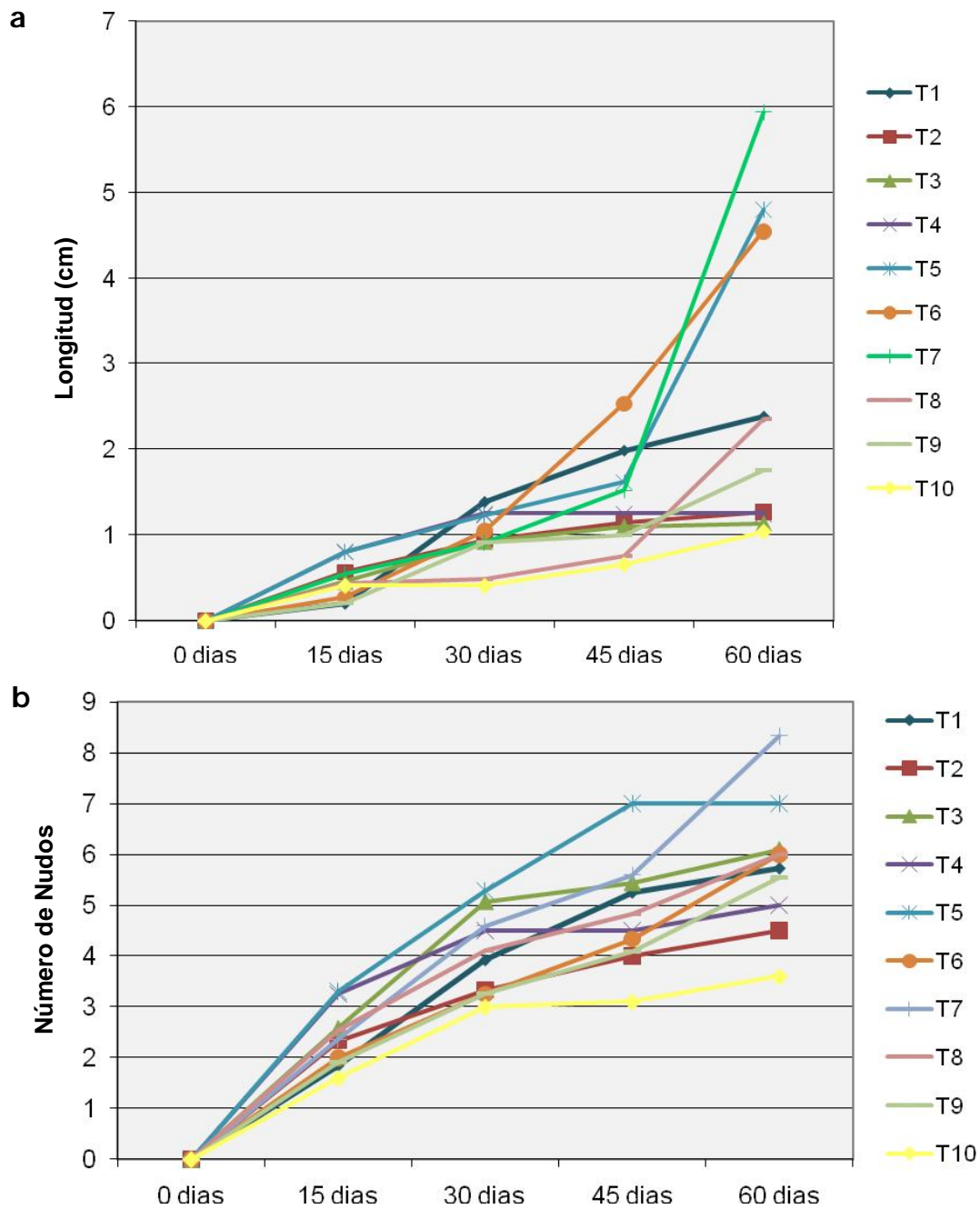
En cuanto a la cantidad de nudos formados en los brotes de *D. tenuicaulis*, después de los primeros 15 días de cultivo, el tratamiento 5 mostró mayor crecimiento, mientras que T1 y T6 tuvieron los valores más bajos ( $p < 0.05$ , tabla 18b) indicando que nuevamente la Kin, pero únicamente en altas concentraciones, fue capaz de inducir una mayor formación de nudos en los brotes y que el subcultivo a un medio libre de hormonas después de 15 días de inducción, potenció su actividad, a diferencia de T4, cuyos valores en longitud son semejantes, pero están dados por la elongación del tallo y no por la formación de nudos. T10 que posee la misma concentración de Kin, permanece en inducción por 30 días, y no 15, como T5, lo cual puede disminuir su actividad en la formación de nudos debido al largo periodo de estímulo. Los tratamientos sin hormonas (T1 y T6) formaron pocos nudos, siendo lo anterior consistente con los resultados obtenidos para la longitud de los brotes (figura 29b). Sin embargo, se observó una tendencia a la homogeneidad de los cultivos, puesto que la diferencia en la formación de nudos se redujo paulatinamente, hasta tomar valores muy semejantes después de 60 días de cultivo (tabla 18b). La inducción de la

formación de nudos por parte de las citocininas, como se mencionó anteriormente, no ha sido reportada.

En *D. brevis*, por el contrario, la formación de los nudos fue mayor en aquellos brotes sometidos a T9 (0.5 mg/l de Kin) durante el primer periodo de inducción (figura 30b, tabla 19b), por lo cual esta hormona y en dicha concentración debió acelerar el proceso, sin embargo, después de realizarse los subcultivos, este crecimiento comenzó a homogeneizarse, alcanzando valores semejantes después de 60 días de cultivo, por lo que finalmente todos los tratamientos ejercieron la misma actividad en la formación de los nudos (tabla 19b).

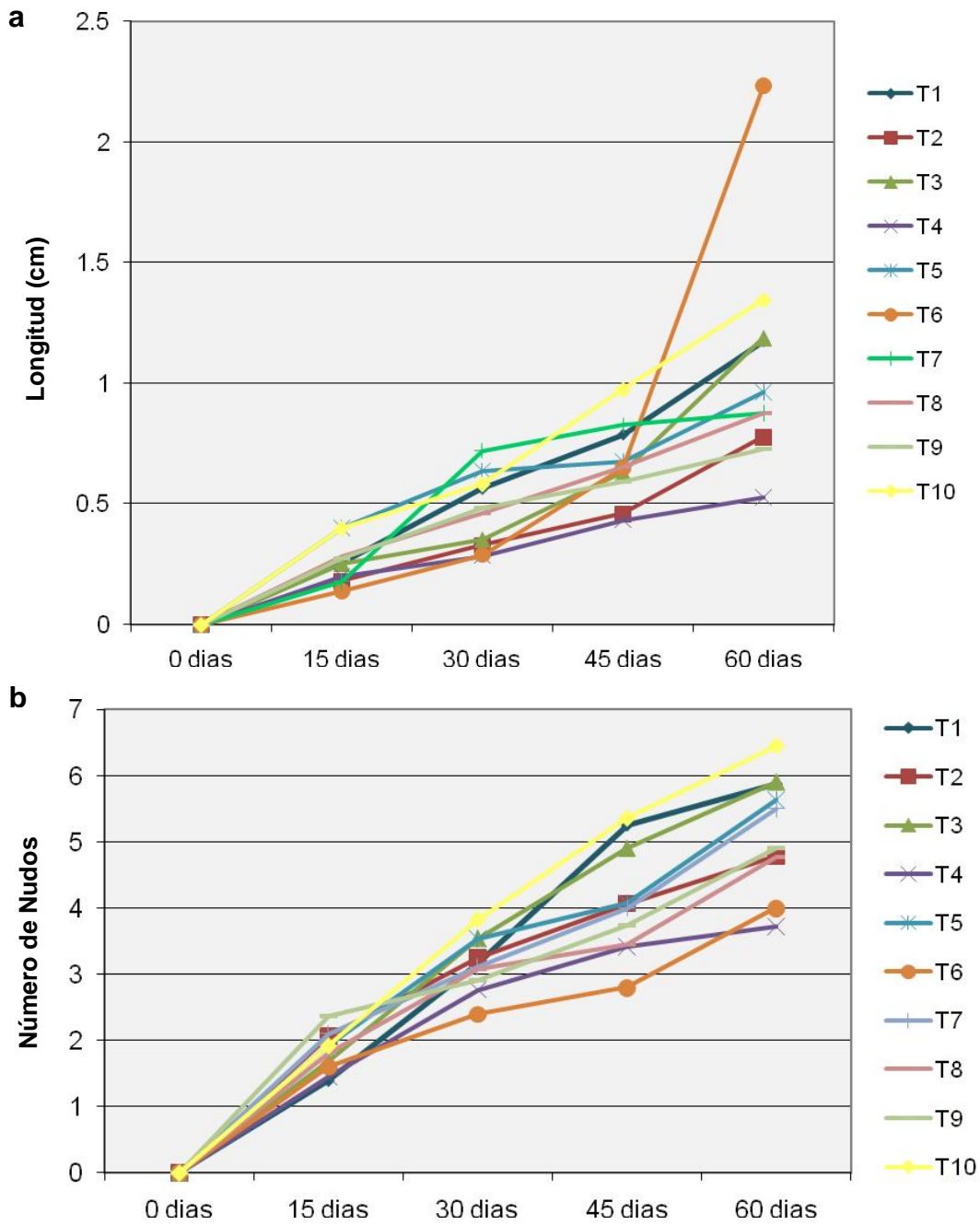
Esta tendencia hacia la homogeneidad de los valores puede deberse al subcultivo a medio basal, pues al eliminar la fuente externa de fitorreguladores, que en un inicio aceleran la formación de nudos, se genera un equilibrio interno que permite que aquellos brotes cultivados en un medio con o sin hormonas formen la misma cantidad de nudos, pues el control endógeno de los brotes es capaz de contrarrestar la actividad de las citocininas asimiladas, detoxificando a las células mediante su *O*-glicosilación y así neutralizar el efecto de éstas (Kakimoto, 2003).

La presencia de raíces en la base de los nudos cultivados en medio basal, y no en los tratamientos adicionados con citocininas, así como la pigmentación rojiza de los brotes generados a partir de los nudos cultivados en medio con reguladores de crecimiento, confirmaron las observaciones realizadas previamente en las regiones apicales de las dos especies estudiadas, indicando que son las citocininas las que inhiben la formación de raíces (George *et al.*, 2008), pero que activan la producción de compuestos, probablemente antocianinas (Hutchinson y Kieber, 2002).



**Figura 29.** Curvas de crecimiento de los brotes provenientes de la activación de yemas axilares de los nudos de *D. tenuicaulis*: **a)** longitud y **b)** número de nudos. T4 y T5 presentan los valores mayores para el crecimiento en longitud después de 15 días de cultivo. T5 mantiene la misma tendencia en la formación de nudos, mientras que T1 y T6 forman pocos. Finalmente ambos parámetros de crecimiento se vuelven homogéneos en todos los tratamientos. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.





**Figura 30.** Curvas de crecimiento de los brotes provenientes de la activación de yemas axilares de los nudos de *D. brevis*: **a)** longitud y **b)** número de nudos. La longitud se muestra homogénea para todos los tratamientos, sin embargo es T6, quien después de un periodo de 60 días de cultivo, muestra un crecimiento en longitud independiente, puesto que los nudos no han sido tratados con hormonas. A pesar de ser T9 quien forma la mayor cantidad de nudos, el crecimiento finalmente se vuelve homogéneo entre todos los tratamientos. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

**Tabla 18.** Promedios de crecimiento de los brotes formados a partir de nudos de *D. tenuicaulis* para los tratamientos en cada periodo de tiempo. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el parámetro de crecimiento evaluado ( $p < 0.05$ ), **a** representando a los valores mayores y **d** a los menores. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

a) Longitud del Brote								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	0.19 ± 0.16	c	1.38 ± 0.91	a	1.98 ± 1.07	a	2.38 ± 1.2	a
2	0.57 ± 0.19	a,b	0.94 ± 0.43	a	1.15 ± 0.68	a	1.27 ± 0.79	a
3	0.46 ± 0.16	b,c	0.93 ± 0.31	a	1.1 ± 0.48	a	1.14 ± 0.5	a
4	0.8 ± 0.33	a	1.25 ± 0.05	a	1.25 ± 0.05	a	1.25 ± 0.05	a
5	0.81 ± 0.21	a	1.24 ± 0.73	a	1.62 ± 1.39	a	4.8 ± 0	a
6	0.28 ± 0.15	b,c	1.05 ± 1.4	a	2.54 ± 3.73	a	4.55 ± 8.56	a
7	0.55 ± 0.2	a,b	0.92 ± 0.27	a	1.52 ± 0.97	a	5.93 ± 2.61	a
8	0.44 ± 0.14	b,c	0.49 ± 0.29	a	0.75 ± 0.64	a	2.35 ± 2.62	a
9	0.21 ± 0.09	c	0.91 ± 0.98	a	1 ± 1.06	a	1.76 ± 1.78	a
10	0.41 ± 0.43	b,c	0.41 ± 0.37	a	0.66 ± 0.76	a	1.04 ± 1.8	a

a) Número de Nudos								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	1.83 ± 0.71	c,d	3.92 ± 1.24	a,b,c	5.25 ± 1.6	a,b	5.73 ± 1.27	a,b
2	2.33 ± 0.49	b,c,d	3.33 ± 0.89	b,c	4 ± 1.41	b	4.5 ± 1.88	b
3	2.58 ± 0.52	a,b,c	5.08 ± 1.08	a,b	5.46 ± 1.81	a,b	6.1 ± 1.52	a,b
4	3.25 ± 1.04	a,b	4.5 ± 0.5	a,b,c	4.5 ± 0.5	a,b	5 ± 0	a,b
5	3.3 ± 0.68	a	5.29 ± 1.11	a	7 ± 0.82	a	7 ± 0.82	a,b
6	2 ± 0.54	c,d	3.25 ± 0.71	c	4.33 ± 1.03	a,b	6 ± 2.19	a,b
7	2.36 ± 0.51	b,c,d	4.6 ± 1.08	a,b,c	5.6 ± 1.67	a,b	8.33 ± 2.08	a
8	2.55 ± 0.52	a,b,c	4.1 ± 1.29	a,b,c	4.83 ± 1.33	a,b	6 ± 2	a,b
9	1.91 ± 0.83	c,d	3.27 ± 1.35	c	4.09 ± 1.7	b	5.56 ± 2.56	a,b
10	1.6 ± 0.68	d	3 ± 1.31	c	3.1 ± 1.37	b	3.6 ± 1.78	b

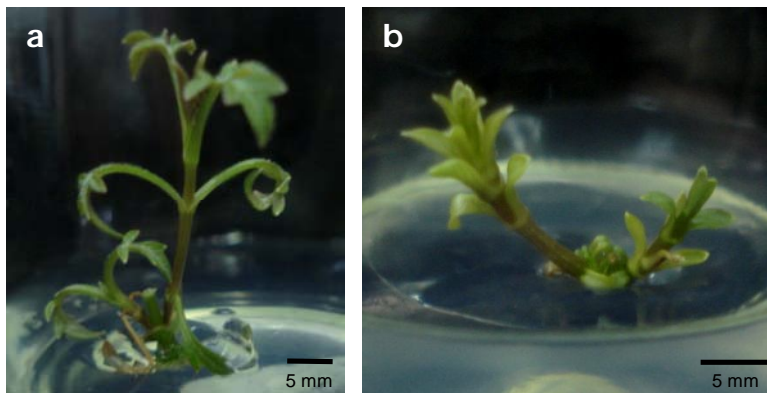
**Tabla 19.** Promedios de crecimiento de los brotes formados a partir de nudos de *D. brevis* para los tratamientos en cada periodo de tiempo. **a)** Crecimiento en longitud en donde se observa una periodicidad del desarrollo. **b)** Número de nudos. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el parámetro de crecimiento evaluado ( $p < 0.05$ ), **a** representando a los valores mayores y **b** a los menores. Ver tabla 7 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

a) Longitud del Brote								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	0.25 ± 0.24	a	0.56 ± 0.68	a,b	0.79 ± 0.31	a	1.18 ± 0.3	a,b
2	0.18 ± 0.1	a	0.33 ± 0.15	a,b	0.46 ± 0.2	a	0.78 ± 0.94	a,b
3	0.25 ± 0.2	a	0.35 ± 0.2	a,b	0.63 ± 0.65	a	1.19 ± 1.78	a,b
4	0.2 ± 0.18	a	0.29 ± 0.17	b	0.43 ± 0.25	a	0.53 ± 0.31	b
5	0.4 ± 1.64	a	0.64 ± 0.39	a,b	0.68 ± 0.42	a	0.96 ± 0.28	a,b
6	0.14 ± 0.29	a	0.29 ± 1.34	b	0.65 ± 0.97	a	2.23 ± 3.52	a
7	0.18 ± 0.11	a	0.72 ± 0.13	a	0.83 ± 0.13	a	0.88 ± 0.13	a,b
8	0.28 ± 0.21	a	0.46 ± 0.15	a,b	0.65 ± 0.26	a	0.88 ± 0.22	a,b
9	0.27 ± 0.14	a	0.46 ± 0.28	a,b	0.59 ± 0.24	a	0.73 ± 0.22	a,b
10	0.4 ± 0.32	a	0.58 ± 0.29	a,b	0.98 ± 0.39	a	1.35 ± 0.19	a,b

b) Número de Nudos								
Tratamiento	Intervalo de Tiempo							
	15 días		30 días		45 días		60 días	
1	1.39 ± 0.51	b	3.15 ± 1.21	a,b	5.25 ± 0.71	a	5.88 ± 1.13	a
2	2.06 ± 0.68	a,b	3.25 ± 0.78	a,b	4.07 ± 1.16	a,b	4.79 ± 1.72	a
3	1.69 ± 0.75	a,b	3.54 ± 1.45	a,b	4.9 ± 2.03	a	5.9 ± 2.85	a
4	1.46 ± 0.88	a,b	2.77 ± 1.09	a,b	3.42 ± 1.17	a,b	3.73 ± 1.56	a
5	1.92 ± 0.76	a,b	3.54 ± 0.88	a,b	4.08 ± 1.75	a,b	5.64 ± 1.29	a
6	1.6 ± 0.52	a,b	2.4 ± 0.97	b	2.8 ± 1.3	b	4 ± 2.65	a
7	2.1 ± 0.57	a,b	3.11 ± 0.78	a,b	4 ± 1	a,b	5.5 ± 2.08	a
8	1.82 ± 0.75	a,b	3.09 ± 0.7	a,b	3.46 ± 0.82	a,b	4.78 ± 1.64	a
9	2.36 ± 0.51	a	2.91 ± 1.05	a,b	3.73 ± 1.62	a,b	4.9 ± 1.45	a
10	1.92 ± 0.76	a,b	3.83 ± 0.94	a	5.36 ± 0.92	a	6.46 ± 1.13	A

En el 97.67% de los casos, se activaron ambas yemas axilares, sin embargo, es concluyente que siempre uno de los brotes originados a partir de los nudos cultivados de ambas especies, mantuvo un desarrollo constante y más rápido que el otro ( $p < 0.05$ ), lo cual puede ser producto de una estrategia de la planta en donde envía la mayor cantidad de recursos a un solo brote, o bien, uno de los brotes, genera dominancia apical sobre el otro, inhibiendo su crecimiento (Pasternak *et al.*, 2005) y contribuyen a la generación de un eje principal de la planta (figura 31).

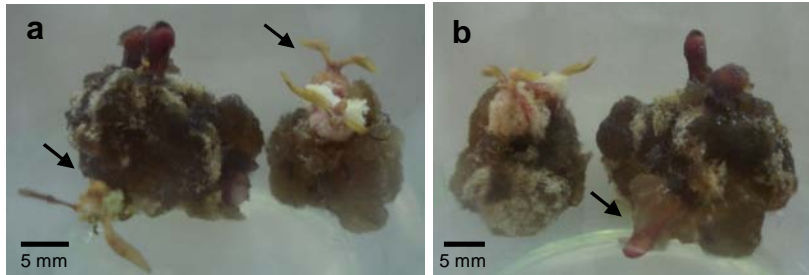


**Figura 31.** Brotes regenerados a partir de un nudo de **a)** *D. tenuicaulis*, y **b)** *D. brevis*. Se observa la clara diferencia de crecimiento entre ambos después de 30 días de cultivo.

Es importante resaltar la presencia de un callo denso y verdoso en la base de los explantes de *D. tenuicaulis*, al igual que las regiones apicales cultivadas, ambos en un medio adicionado con citocininas. La formación de este tejido fue producto de dichos reguladores, que en conjunto con las hormonas endógenas, probablemente las auxinas, promovieron su crecimiento constante (George *et al.*, 2008), y la diferenciación de cloroplastos (Hutchinson y Kieber, 2002)

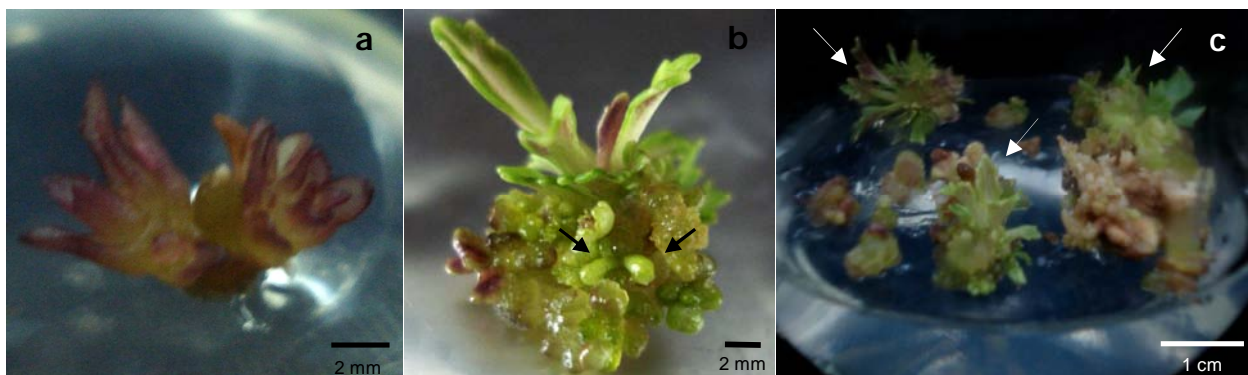
Un resultado interesante fue la ausencia del crecimiento de brotes a partir de las yemas axilares un nudo de T1 (medio basal), pero se observó la formación de un callo esponjoso, traslúcido con coloración café claro, que después de permanecer en el mismo medio de cultivo por un periodo de 7 meses y alcanzar

un tamaño de 9.5 cm<sup>3</sup>, comenzó a oxidarse, a pesar de lo cual mostró actividad organogénica, pues a partir de éste se formaron pequeños brotes (figura 32a), los cuales a pesar de haber sido subcultivados, permanecieron en un estado de arresto, no obstante, a partir de este subcultivo se formaron pequeñas raíces en la base el callo (figura 32b).



**Figura 32.** Callos formados a partir de nudos de *D. tenuicaulis* cultivados en medio basal: **a)** formación de brotes (flecha) en el medio de origen, y **b)** de raíces (flecha) después del subcultivo a medio basal.

Por otro lado, en un nudo hiperhidratado de T2 (BA 0.5 mg/l; figura 33a), se observó la formación de formas globulares, con coloración amarilla y verde (figura 33b), las cuales, al ser subcultivadas a medio basal se multiplicaron y algunas de ellas comenzaron su desarrollo formando numerosos brotes (figura 33c). La forma, color y respuesta ante el subcultivo, sugieren que estas estructuras son embriones somáticos, hecho que se podría evidenciar mediante cortes histológicos. La hiperhidratación es una respuesta que puede generar un estrés oxidativo en el tejido y causar su necrosis, sin embargo, las citocininas aplicadas suprimen la senescencia (Pennell y Lamb, 1997), permitiendo, que la mínima concentración endógena de auxinas, en conjunto con dicho estrés oxidativo, estimulen la formación de embriones somáticos (Pasternak *et al.*, 2005).



**Figura 33.** Nudo hiperhidratado de *D. tenuicaulis* sometido a 0.5 mg/l de BA (a), que formó estructuras globulares, probablemente embriones somáticos (flechas negras, b), con abundante formación de brotes (flechas blancas) después del subcultivo a medio basal (c).

González (1999) realizó el cultivo *in vitro* de nudos de *D. imperialis* y *D. excelsa*, ambas de hábito arborescente, y cuya oxidación al igual que la de las regiones apicales fue sumamente elevada a pesar de la aplicación de diversos tratamientos. El presente estudio logró la viabilidad del 100% de los nudos de *D. tenuicaulis*, arborescente también, mediante la aplicación de PVP (500 mg/l) y un lavado previo a la siembra, con una mezcla de dos antioxidantes: ácido ascórbico 150 mg/l + ácido cítrico 150 mg/l.

AIB y  $GA_3$  fueron aplicados de forma exitosa en el cultivo de nudos de *D. imperialis* y *D. excelsa*, logrando una longitud promedio de 3.51 cm en los brotes de *D. imperialis* (González, 1999). En este estudio, por el contrario, se aplicaron citocininas, promoviendo también la activación de las yemas axilares y la generación de brotes de mayor longitud en ambas especies: *D. tenuicaulis* y *D. brevis*.

## **Inducción de callo a partir de hojas**

Los tratamientos a los cuales fueron sometidos los explantes de hoja de *D. tenuicaulis* mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) después de 60 días de cultivo. En la tabla 20 se muestran los promedios de crecimiento para cada uno de los tratamientos en donde podemos observar que T1 (medio basal), T2 (2,4-D 0.5 mg/l), T3 (BA 0.5 mg/l), T5 (BA 2 mg/l), T7 (Kin 0.5 mg/l) y T9 (Kin 2.0 mg/l) tuvieron un crecimiento nulo respecto al resto de los tratamientos (figura 34a), lo anterior estuvo relacionado de forma importante con la presencia de citocininas y auxinas, demostrando que fue necesario el estímulo externo de ambas hormonas que promuevan el crecimiento de células indiferenciadas en *D. tenuicaulis*, y que en dicotiledóneas, ha demostrado ser de gran relevancia (George *et al.*, 2008).

Los tratamientos a los cuales fueron sometidos los explantes de hoja de *D. brevis* mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) después de 60 días de cultivo (tabla 20), pero a diferencia de los resultados descritos anteriormente, T5 obtuvo el mayor crecimiento, mientras que T1 y T7 no formaron callos (figura 34b), evidenciando que en *D. brevis*, fue necesaria la inducción hormonal para su formación, pero no la aplicación externa de ambas hormonas como en *D. tenuicaulis*, pues las hojas jóvenes cultivadas poseen una biosíntesis intensa de auxinas (Taiz y Zeiger, 2006), siendo ésta la fuente de dichas hormonas, que interactúan con las citocininas externas (Cline, 1976), ambas necesarias para la formación de callos (George *et al.*, 2008). La BA fue más potente que la Kin, pues indujo la formación y crecimiento de los callos en cualquier concentración (0.5 y 2 mg/l), mientras que la Kin únicamente en concentraciones altas (2 mg/l), presentes en T9 y T10, o en combinación con auxinas externas.

Este resultado fue congruente con lo observado en ápices y nudos cultivados de ambas especies, demostrando que el comportamiento de *D. tenuicaulis* fue influenciado de manera más crítica por la presencia de las hormonas, mientras

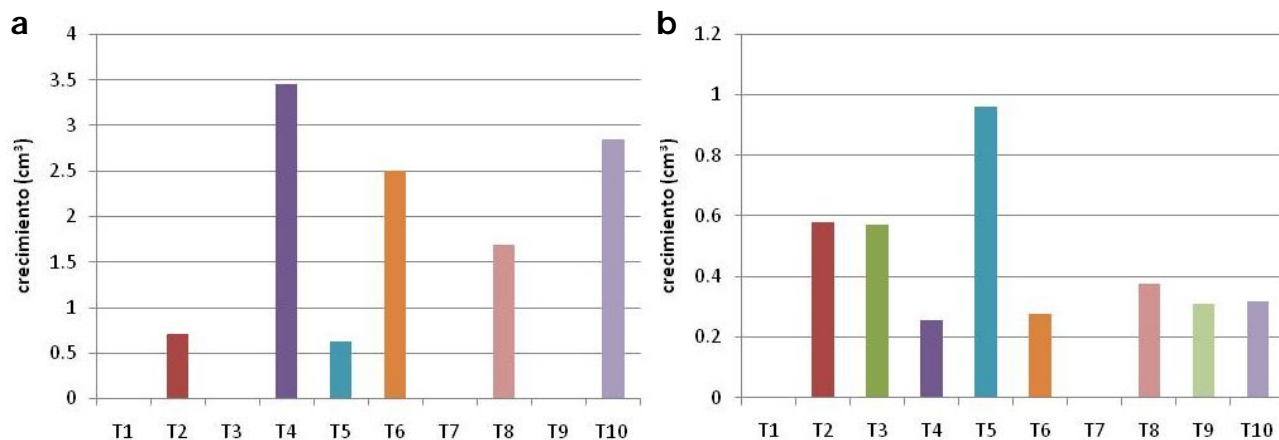
que *D. brevis* fue más independiente y logró un mayor balance entre los fitorreguladores y las hormonas endógenas que permitió la sobrevivencia de los tejidos cultivados y el desarrollo de callos a partir de éstos.

Estudios previos indican que el desarrollo de callo a partir de segmentos de hojas de *D. pinnata* se lleva a cabo mediante la aplicación de una combinación entre Kin y ANA (Read y Gavilertvatana, 1976), en donde ambos fitorreguladores son necesarios, al igual que en *D. tenuicaulis*, mientras que en *D. excelsa* y *D. imperialis*, la sola presencia de BA, Kin y 2iP, son capaces de inducir la formación de callo, siendo BA la que promovió un mayor crecimiento de callos (González, 1999), similar a lo observado en *D. brevis*. Zaragoza (2004), quien realizó el cultivo *in vitro* de cotiledones de *D. imperialis* reportó la formación de callo mediante la aplicación de una combinación de auxinas (AIA, ANA, TDZ y 2,4-D), así como en *D. brevis*, en donde la adición de 2,4-D indujo la generación de callo, y no así en *D. tenuicaulis*.

**Tabla 20.** Promedio de formación de callos a partir de explantes de hoja de *D. tenuicaulis* y *D. brevis*, después de 60 días de inducción. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el crecimiento y formación de callo ( $p < 0.05$ ), **a** representa los valores mayores y **d** los menores. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Crecimiento Promedio (cm <sup>3</sup> )			
	<i>D. tenuicaulis</i>		<i>D. brevis</i>	
1	0 ± 0	d	0 ± 0	c
2	0.71 ± 0.79	c,d	0.58 ± 0.19	a,b
3	0 ± 0	d	0.57 ± 0.48	a,b
4	3.45 ± 1.74	a	0.26 ± 0.15	b,c
5	0.25 ± 0.43	d	0.96 ± 0.57	a
6	2.5 ± 0.85	a,b	0.28 ± 0.18	b,c
7	0 ± 0	d	0 ± 0	c
8	1.68 ± 0.85	b,c	0.38 ± 0.21	b,c
9	0 ± 0	d	0.31 ± 0.24	b,c
10	2.85 ± 1.67	a,b	0.32 ± 0.24	b,c



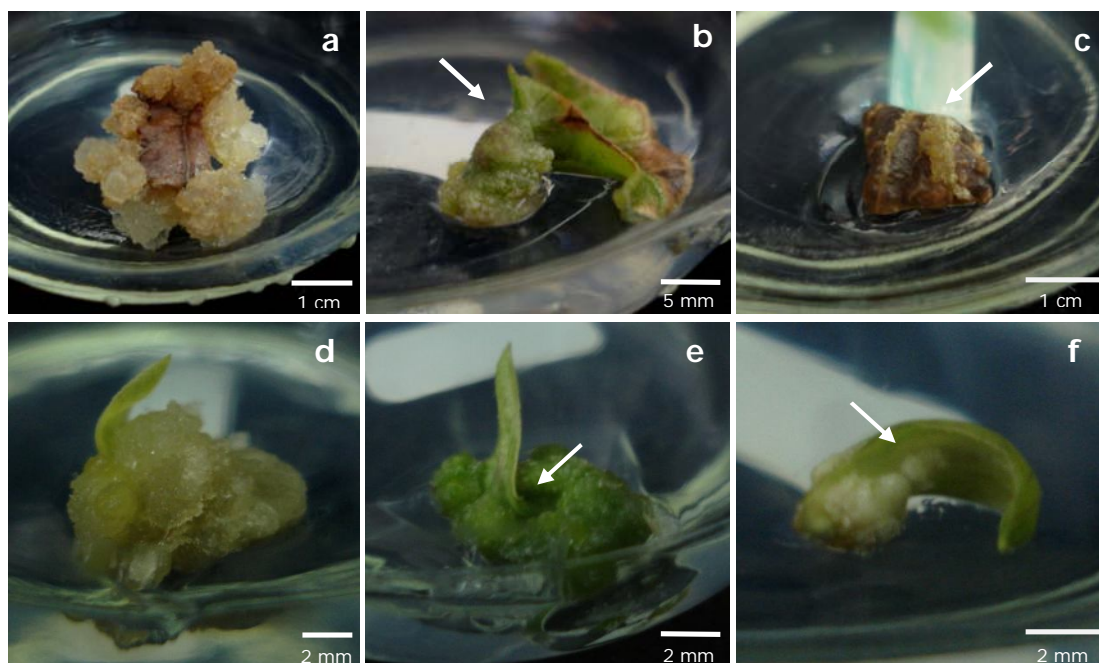


**Figura 34.** Promedio de crecimiento de los callos formados a partir de explantes de hoja de *D. tenuicaulis* (a) y *D. brevis* (b), después de 60 días de inducción. En *D. tenuicaulis* fue necesaria la presencia de auxinas y citocininas, mientras que en *D. brevis* la presencia de 2,4-D o BA en cualquier concentración, fue capaz de promover su formación. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

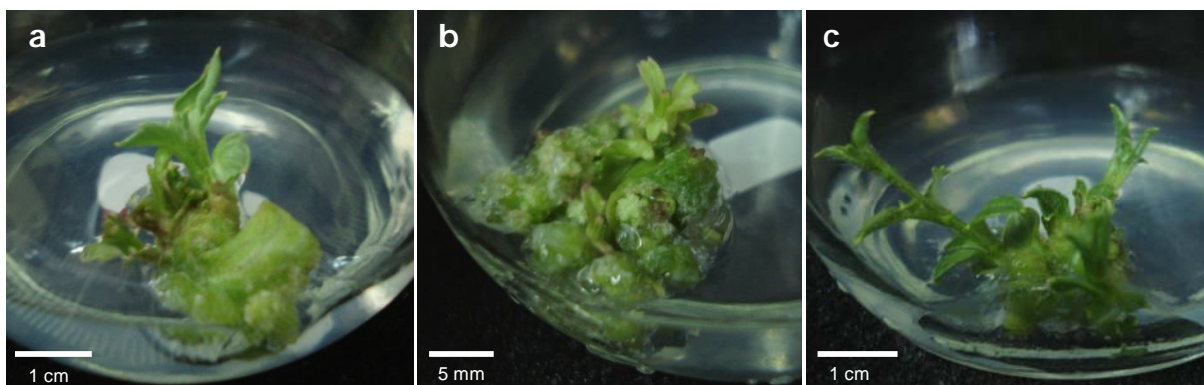
Es de suma importancia señalar que la integridad del tejido se conservó en los explantes de ambas especies (figuras 35a y d), de forma que las hormonas no indujeron la desdiferenciación de las células, pero sí promovieron la división celular y la formación y crecimiento en masa de células indiferenciadas cuya iniciación se dió a partir de la zona de corte basal respecto a la posición original de la hoja en la planta (figura 35b y e), o bien, de la venación superior o inferior respecto a la superficie de la hoja, ya sea central o secundaria, de los explantes (figuras 35c y f). Read y Gavilertvatana (1976) reportaron que la formación de callo inició también en el extremo proximal de las hojas y continuó hacia la superficie adaxial de éstas, encontrando una mayor formación de callo en los explantes que contenían la venación central de las hojas cultivadas de *D. pinnata*.

A diferencia de *D. tenuicaulis*, en *D. brevis*, los tratamientos 3, 5 y 9, formaron callos organogénicos, ya que generaron brotes (figura 36), en el 30, 50 y 10% respectivamente, indicando que la BA fue el fitorregulador que indujo este evento, aunque la cinetina en altas concentraciones fue capaz de hacerlo también, pero en menor porcentaje. Así las citocininas, son fitorreguladores capaces de

formar brotes de *novo* a partir de callos generados *in vitro* (Kakimoto, 2003; Woodward y Bartel, 2005).



**Figura 35.** Durante la formación y crecimiento de los callos, el tejido se mantiene íntegro, de forma que no hay desdiferenciación del tejido (**a** y **d**), iniciando el crecimiento a partir de la zona de corte basal de la hoja (**b** y **e**, flecha blanca), o bien, a partir de la venación central o secundaria (**c** y **f**, flecha negra). **a**, **b** y **c** corresponden a *D. tenuicaulis*, **d**, **e** y **f**, a *D. brevis*.



**Figura 36.** Organogénesis indirecta a partir del callo proveniente de hojas de *D. brevis*, después de 60 días de inducción. **a)** T3, **b)** T5 y **c)** T9.

De acuerdo a lo anterior, se realizó un análisis estadístico mediante la selección de aquellos tratamientos que formaron un volumen adecuado para someterse a la siguiente etapa de inducción de organogénesis y proliferación celular, con el propósito de obtener mayor biomasa para el análisis fitoquímico. En esta fase, el subcultivo se realizó a tres o dos diferentes medios de cultivo, considerando el medio de origen de la forma descrita en el método (tabla 9). Los tratamientos considerados para el análisis estadístico en esta etapa fueron: T4, T6, T8 y T10, de *D. tenuicaulis*; y T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9 y T10 de *D. brevis*. A pesar de no haber incluido el análisis estadístico de aquellos tratamientos que formaron una pequeña cantidad de callo, se realizaron subcultivos al medio de origen y medio basal, para evaluar la posible respuesta organogénica de la totalidad de tratamientos.

En *D. tenuicaulis*, el procedimiento anterior mostró, como una generalidad, un crecimiento inicial homogéneo en todos los tratamientos (figura 37), sin embargo, fue después de un periodo de 30 días de cultivo cuando se observó mayor crecimiento ( $p < 0.05$ ) en T4.2, T4.3 y T6.2 (figuras 37a y b), es decir, en aquellos que contenían BA, en comparación con los callos subcultivados a medio basal, mientras que en los tratamientos que contenían Kin en alta concentración (2mg/l), T10.2 y T10.3, las diferencias se presentaron después de los 45 días de cultivo (figura 37d), y cuando estuvo presente en menor cantidad (0.5mg/l), T8.2 y T8.3, no indujo un crecimiento significativo de biomasa, aun después de los 60 días de cultivo (figura 37c). Dichos resultados indicaron que la BA fue más potente respecto a la Kin, pues fue capaz de inducir la proliferación celular con mayor rapidez. La presencia de citocininas induce la división celular (Hutchinson y Kieber, 2002), evento que se hizo evidente debido el aumento en la biomasa de los callos, y no así en los cultivados en medio basal, en donde, los callos subcultivados al medio de origen, que contenían ambas hormonas, auxinas y citocininas, obtuvieron los valores más altos, demostrando que el balance de estas hormonas es de gran importancia para el crecimiento de los callos (George *et al.*, 2008).

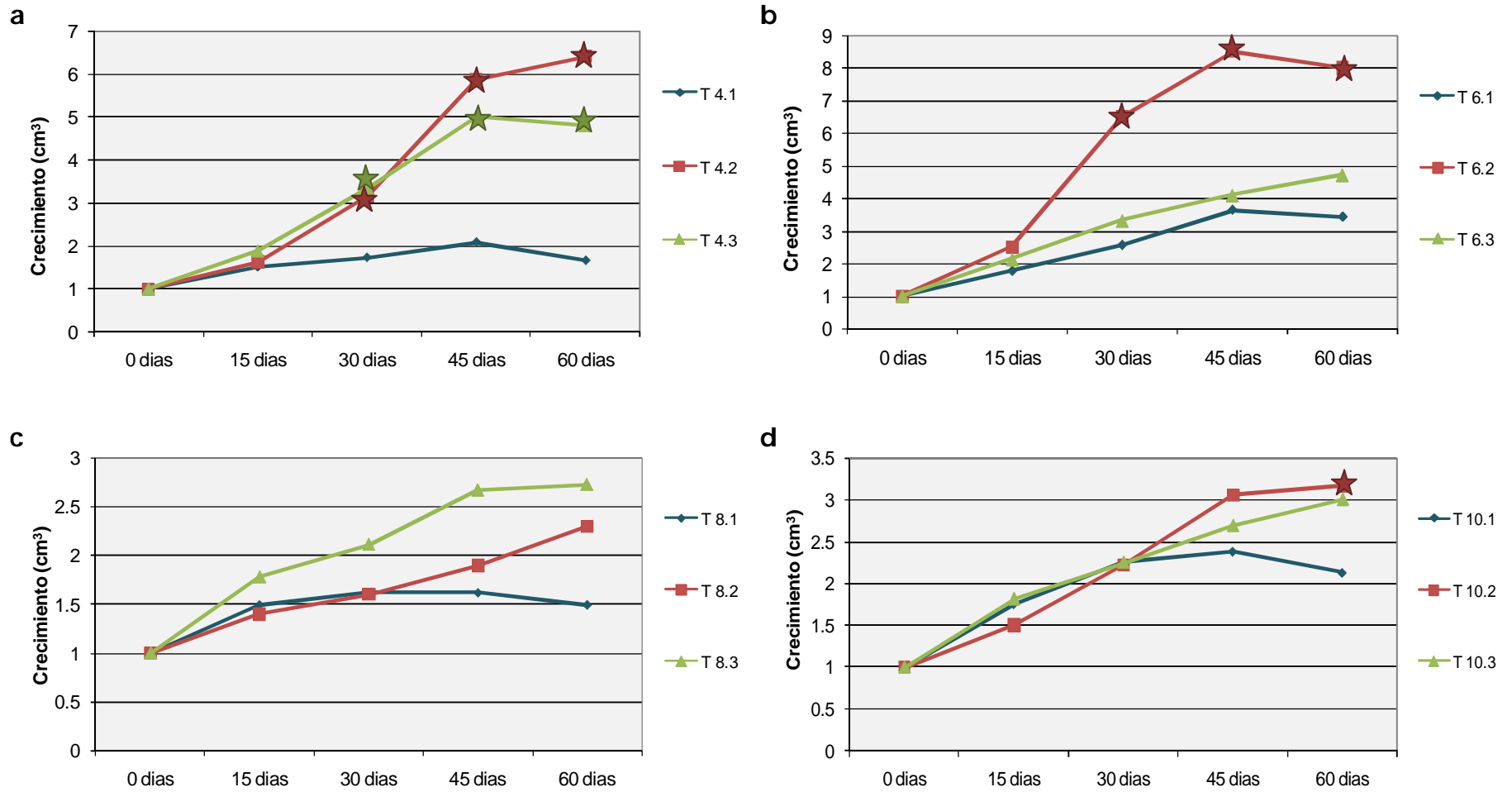
El comportamiento de los callos provenientes de hojas de *D. brevis* fue homogéneo en T2 (figura 38a), pues a pesar de que la curva mostró mayor proliferación de los callos subcultivados al medio de origen, es decir, a aquel que conservó la aplicación de auxinas (2,4-D 0.5 mg/l), a diferencia de *D. tenuicaulis*, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Este resultado implica que, a pesar de haber eliminado el fitorregulador del medio de cultivo en T2.1, el impulso hormonal previo fue suficiente para mantener un crecimiento semejante a T2.2, en donde se conservó la concentración de auxinas, que regulan positivamente los cambios en la tasa de división celular (Leyser, 2002).

Los subcultivos que corresponden a T3, T5 y T9 de *D. brevis*, tuvieron un comportamiento similar pues hubo un crecimiento inicial homogéneo (figuras 38b, c y d), pero, después de 60 días en T3, 30 días en T5 y 45 días en T9, hubo un crecimiento significativamente mayor en los subcultivos que mantuvieron la concentración inicial de citocininas (T3.2: BA 0.5 mg/l, T5.2: BA 2 mg/L y T9.2: Kin 2 mg/l), puesto que la presencia de éstas induce la proliferación celular (Hutchinson y Kieber, 2002), siendo la BA más potente que Kin, pues fue capaz de inducir la división celular más rápido, efecto antes observado en *D. tenuicaulis*. En T5, sin embargo, el crecimiento se hizo homogéneo después de 45 días de cultivo (figura 38c), implicando que la constante presencia de BA, pudo inducir su O-glicosilación que permite el control mediante su inactivación (Kakimoto, 2003).

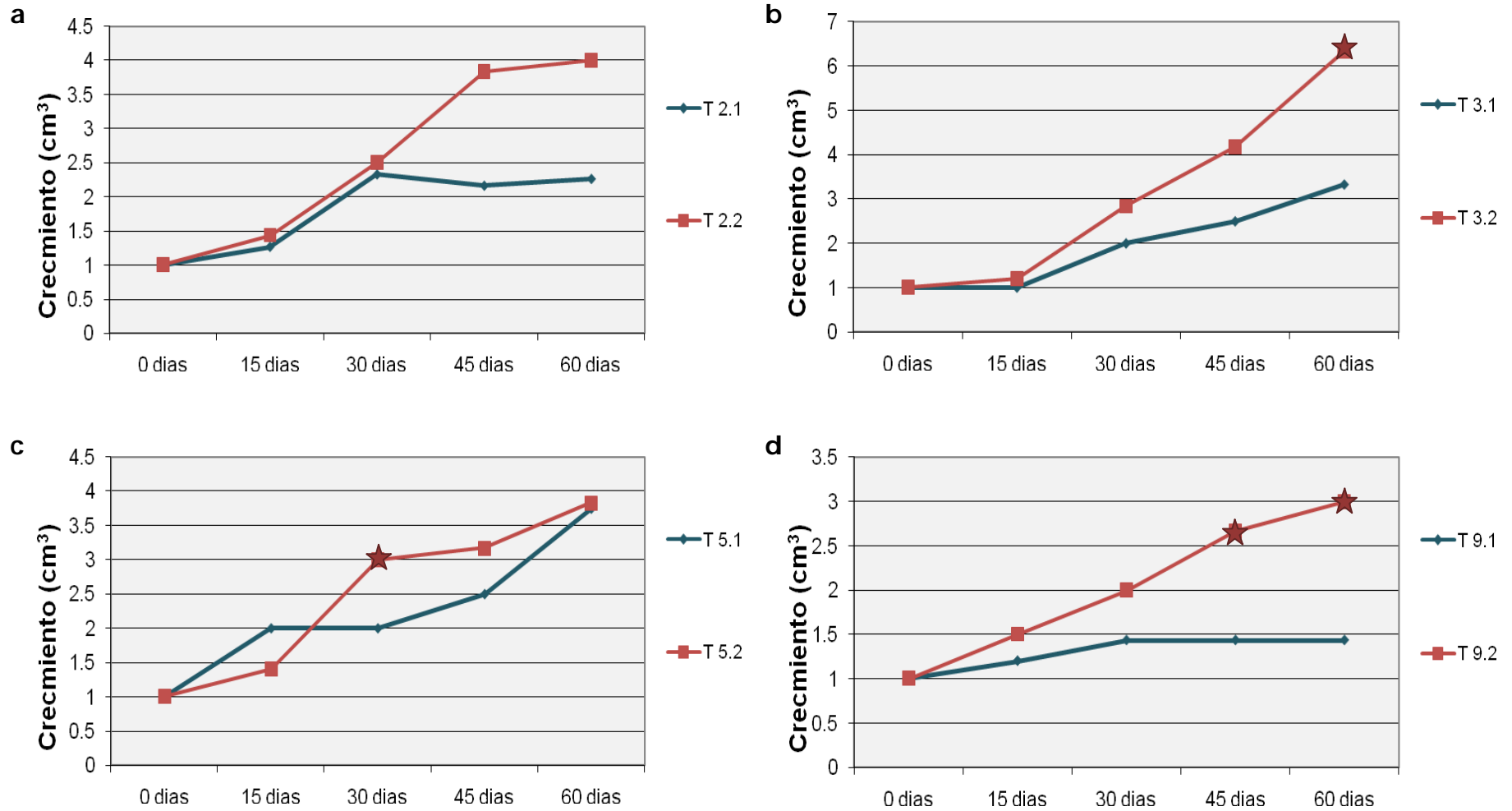
Los tratamientos sometidos a 3 subcultivos diferentes, es decir, T4, T6, T8 y T10, en *D. brevis*, no mostraron diferencias significativas después de 60 días de inducción, a pesar de que en las curvas de crecimiento (figura 39) se observó una tendencia hacia un crecimiento mayor en todos los tratamientos que conservaron citocininas (T4.2, T4.3, T6.2, T6.3, T8.2, T8.3, T10.2 y T10.3), a diferencia de los subcultivos en medio basal (T4.1, T6.1, T8.1 y T10.1), por lo cual es probable que esta diferencia se presente en un periodo de tiempo posterior a los 60 días de cultivo.

Lo anterior es de suma importancia, pues contrario a lo que ocurre en *D. tenuicaulis*, *D. brevis* posee mayor independencia en su desarrollo, necesitando probablemente un mayor tiempo de inducción y/o una mayor concentración de fitorreguladores para presentar diferencias entre los subcultivos. No obstante la tendencia a presentar el mismo comportamiento fue evidente, lográndose distinguir tres etapas: inducción de la división celular, división celular activa, y disminución y finalización de la división celular (George *et al.*, 2008).

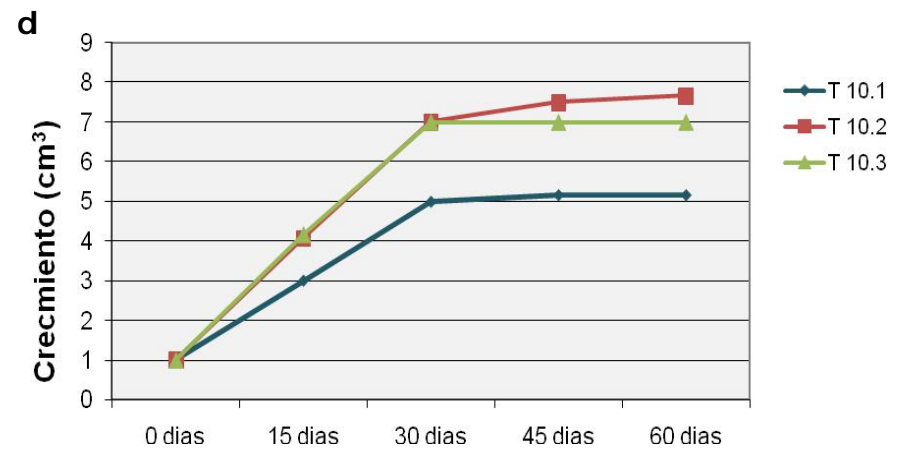
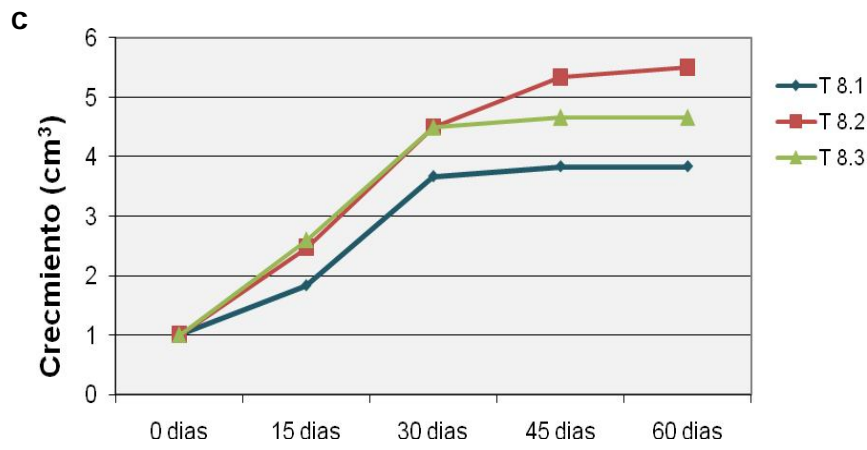
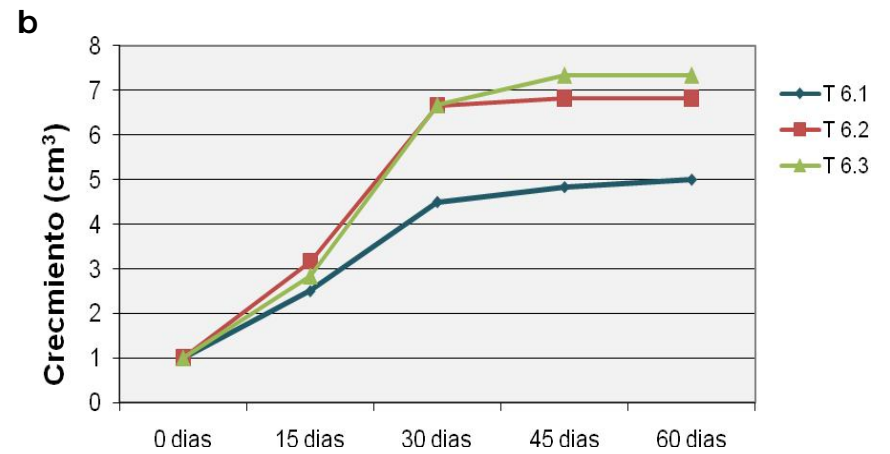
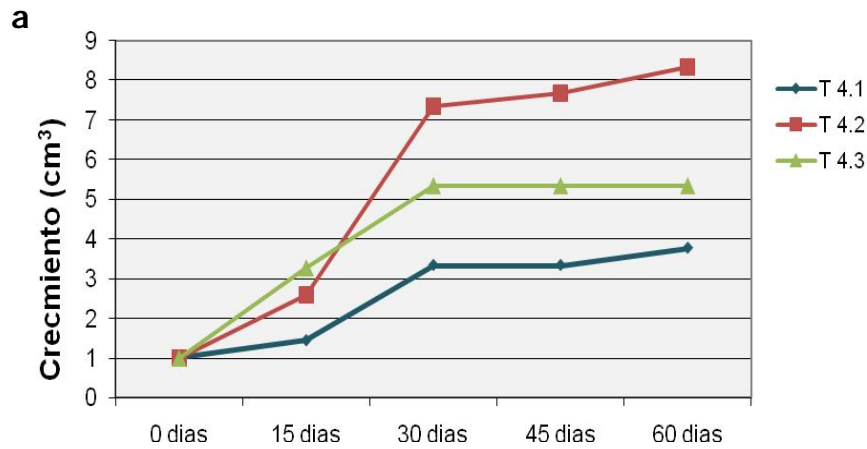
Como una generalidad, se observó un descenso en el crecimiento de los callos de ambas especies después de 45 días, o bien, éstos comienzan a oxidarse. Consecuentemente es recomendable que después de este periodo se realice un nuevo subcultivo que permita el continuo crecimiento de los callos y la obtención de mayor biomasa.



**Figura 37.** Curvas de crecimiento de los callos de hojas de *D. tenuicaulis* sometidos a un subcultivo en tres diferentes tratamientos: 1-basal, 2-medio de origen, y 3-medio con la citocinina de origen. Tratamientos provenientes del medio adicionado con: **a)** 2,4-D 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l, **b)** 2,4-D 0.5 mg/l + BA 1 mg/l, **c)** 2,4-D 0.5 mg/l + Kin 0.5 mg/l, y **d)** 2,4-D 0.5 mg/l + Kin 1 mg/l. Fue notable el aumento en biomasa para los tratamientos que contenían BA (T4.2, T4.3 y T6.2) después de los 30 días de subcultivo, y para aquellos que tuvieron Kin 2 mg/l (T10.2 y 10.3), esta diferencia en crecimiento se presenta después de los 45 días, mientras que para aquellos tratamientos que tuvieron Kin 0.5 (T8.2 y T8.3) no hubo una diferencia respecto a los callos subcultivados a medio basal. Las estrellas indican diferencias significativas en el volumen de los callos en el periodo de tiempo señalado. Ver tabla 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



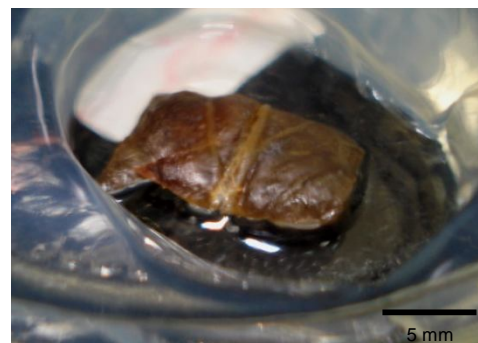
**Figura 38.** Curvas de crecimiento para los callos de hojas de *D. brevis*, sometidos a un subcultivo en dos diferentes tratamientos: 1- basal, 2- medio de origen. **a)** T2.1 y T2.2 muestran un crecimiento homogéneo sin diferencias estadísticamente significativas. **b)** T3.2 presentó mayor crecimiento después de 60 días de cultivo debido a la presencia de BA. **c)** El mantenimiento de la alta concentración de BA en los cultivos permitió la alta proliferación celular en T5.2 después de 30 días de cultivo, aunque después de 45 días, tuvo un efecto inhibitorio. **d)** T9.2 aumentó significativamente su crecimiento después de 45 días de cultivo por la presencia de Kin en altas concentraciones. Las estrellas indican diferencias significativas en el volumen de los callos en el periodo de tiempo señalado. Ver tabla 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 39.** Curvas de crecimiento para los callos de hojas de *D. brevis* sometidos a un subcultivo en tres diferentes tratamientos: 1- basal, 2- medio de origen, y 3- medio con la citocinina de origen. A pesar de no encontrarse diferencias significativas, se observó una tendencia al aumento acelerado en la biomasa de los tratamientos que conservaron las citocininas, a diferencia de aquellos que fueron subcultivados a medio basal (T4.1, T6.1, T8.1 y T10.1). Ver tabla 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



En *D. tenuicaulis*, los explantes de hoja sometidos a los tratamientos 1, 3, 7 y 9, se oxidaron por completo en la primera fase (figura 40a), causando una necrosis del tejido, pues el pudo promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , moléculas que inician las cascadas de señalización que culminan con la muerte celular programada (Pennell y Lamb, 1997).



**Figura 40.** Explante de hoja de *D. tenuicaulis*, oxidado y necrosado después de 60 días de cultivo.

Los cultivos de explantes de hoja de T2 y T5 de *D. tenuicaulis*, se mantuvieron con un crecimiento lento pero constante, logrando la formación de pequeños callos. Los callos de T2 (2,4-D 0.5 mg/l) fueron friables, translúcidos y de color café claro a medio (figura 41a), y conservaron esta apariencia cuando fueron subcultivados al medio de origen (figura 41b), generando diversas zonas con puntos congregados color rojo (figuras 41c). La apariencia de estos callos probablemente se debió a la actividad de las auxinas aplicadas, pues pudieron inducir la dispersión celular e inhibición de la formación de clorofilas, siendo el 2,4-D la auxina que ha mostrado tener mayor actividad (George *et al.*, 2008).

Los callos de T5 de *D. tenuicaulis*, por otro lado, fueron densos, con algunas zonas opacas y otras translúcidas color verde (figura 42a), aun después del subcultivo (figura 42e). Los callos generados a partir de los tratamientos 2 y 5 no fueron organogénicos. Las citocininas externas inducen la formación de agregados celulares (George *et al.*, 2008), y por lo tanto, la formación de callos densos, además de promover la formación de clorofilas (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003).

Los callos formados a partir de las hojas de *D. brevis*, se tornaron friables y translúcidos con una coloración amarillenta en T2 (figura 41d), presentando,

posterior al subcultivo, zonas cafés en diferentes tonalidades (figura 41e), y zonas con puntos congregados color rojo en los callos subcultivados a medio basal (T2.1; figura 41f), al igual que en *D. tenuicaulis*. Esta misma respuesta fue observada en los callos de *D. tenuicaulis* con la misma inducción hormonal, efecto que atribuimos nuevamente a la presencia de 2,4-D (George *et al.*, 2008). Los callos generados a partir de T2 no fueron organogénicos.

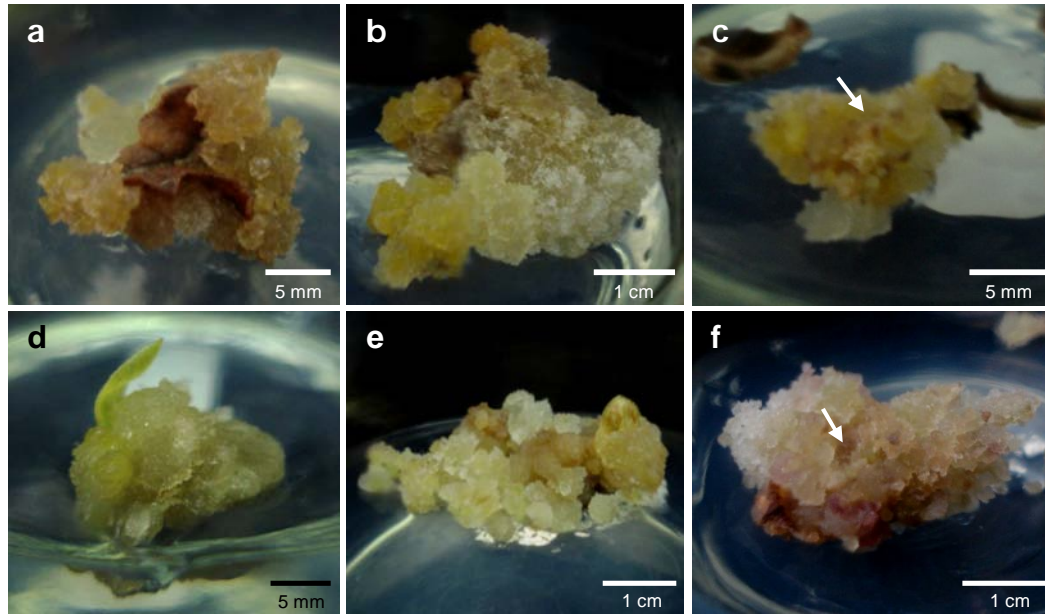
A diferencia de este fenotipo, los tratamientos 3, 5 y 9 *D. brevis*, fueron densos, translúcidos y con una coloración verde intensa (figuras 42b, c y d), con algunas áreas cafés en los cultivos en donde se mantuvieron las citocininas (T3.2, T5.2 y T9.2) y, en los subcultivos de T3 y T5 a medio basal (T3.2 y T5.2), zonas con puntos congregados color rojo en los callos subcultivados a medio basal (figura 42f, g y h). Todos los callos formaron abundantes brotes alrededor de éste (figura 42f y g), generando raíces sólo los subcultivados en medio basal de T3 y T9 (figura 42f e i). Al igual que en *D. tenuicaulis*, la inducción, únicamente por citocininas, fue capaz de generar callos densos y fotosintéticos (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003; George *et al.*, 2008). Zaragoza (2004), quien realizó el cultivo *in vitro* de cotiledones de *D. imperialis* y obtuvo callo mediante la aplicación de auxinas, reportó la formación de brotes en los subcultivos en donde se adicionaron citocininas. Las citocininas promueven la organogénesis directa o indirecta de brotes, ya que en altas concentraciones, promueven la producción de auxinas, así, la interacción de ambas permite obtener el balance para el crecimiento adecuado de los brotes generados a partir de callo (Woodward y Bartel, 2005; George *et al.*, 2008).

Los callos provenientes de los tratamientos 4, 6, 8, y 10 de *D. tenuicaulis*, se tornaron friables, translúcidos y de color café tenue (figuras 43a, b, c y d), y tuvieron respuestas similares ante el subcultivo, aquellos callos obtenidos a partir de los tratamientos 4.1, 4.2, 6.1, 6.2, 8.1, 8.2, 10.1 y 10.2, es decir, los que fueron subcultivados a medio basal y al medio de origen, se tornaron translúcidos

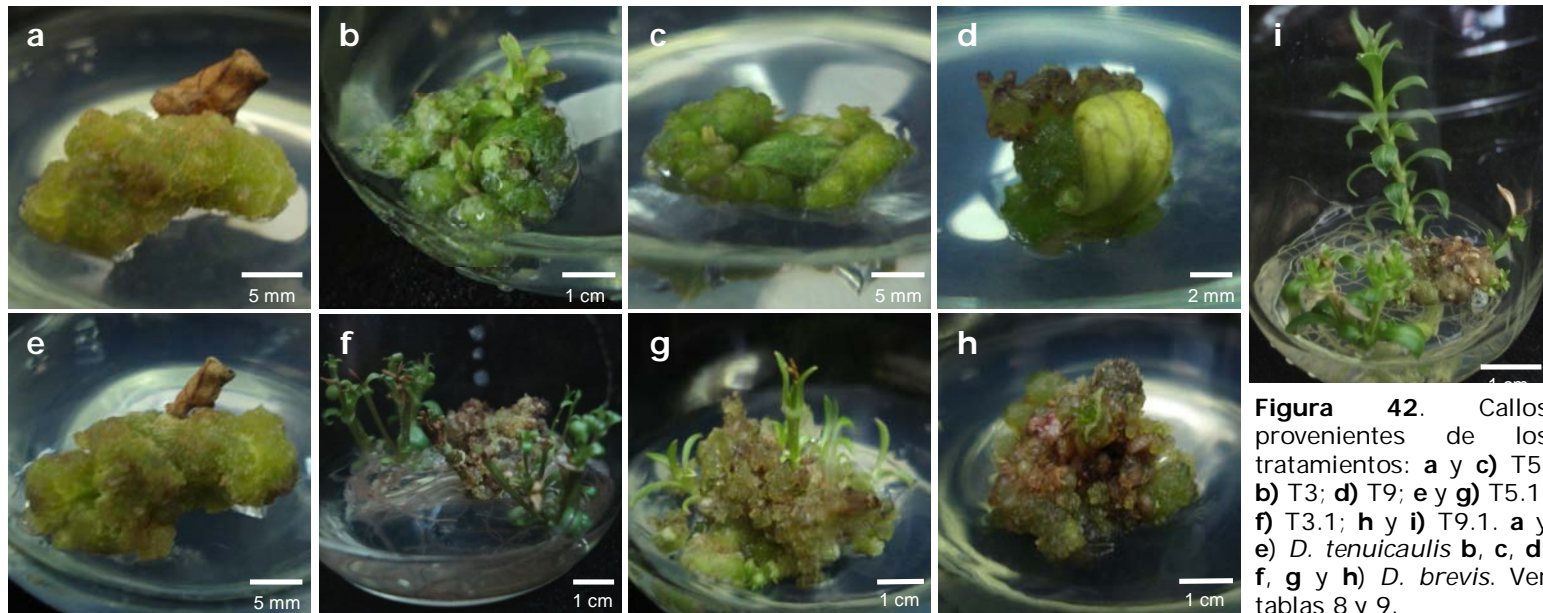
en algunas zonas y opacos en otras, friables y con coloración café en diversos tonos, en algunos casos con zonas rojizas (figuras 43e, f, g y h). Los callos de T4.3, T6.3, T8.3 y T10.3, en donde se mantuvo únicamente la concentración de citocininas, por el contrario, mostraron diferentes coloraciones, ya que en el ápice del callo el color fue predominante café, mientras que en la base y extremos se presentaban zonas verdes y amarillas intensas, opacos en la mayor parte y friables (figuras 43i, j, k y l). En los tratamientos 8.1 y 10.1 se formaron raíces después de 15 días de subcultivo, sin embargo, este hecho se presentó sólo en una repetición de cada tratamiento (figuras 43m y n).

Los subcultivos provenientes de los tratamientos 4, 6, 8, y 10 de *D. brevis*, tuvieron respuestas similares ante el subcultivo, siendo todos translúcidos y friables, de color amarillo tenue, con una tonalidad verdosa (figura 44a, b, c y d). Los callos subcultivados a medio basal conservaron estas características, aunque también, al igual que *D. tenuicaulis*, generaron zonas rojizas (figura 44e, f, g y h). En los subcultivos a medio con citocininas, algunas zonas se tornaron cafés con algunos puntos rojos (figura 44i, j, k y l). No se presentó la formación de brotes, pero sí de raíces en los tratamientos T4.1, T6.1, T8.1 y 10.1, es decir, aquellos en donde se eliminaron las hormonas por completo, pero provenientes de un medio con auxinas y citocininas (figura 44m y n), al igual que en *D. tenuicaulis*.

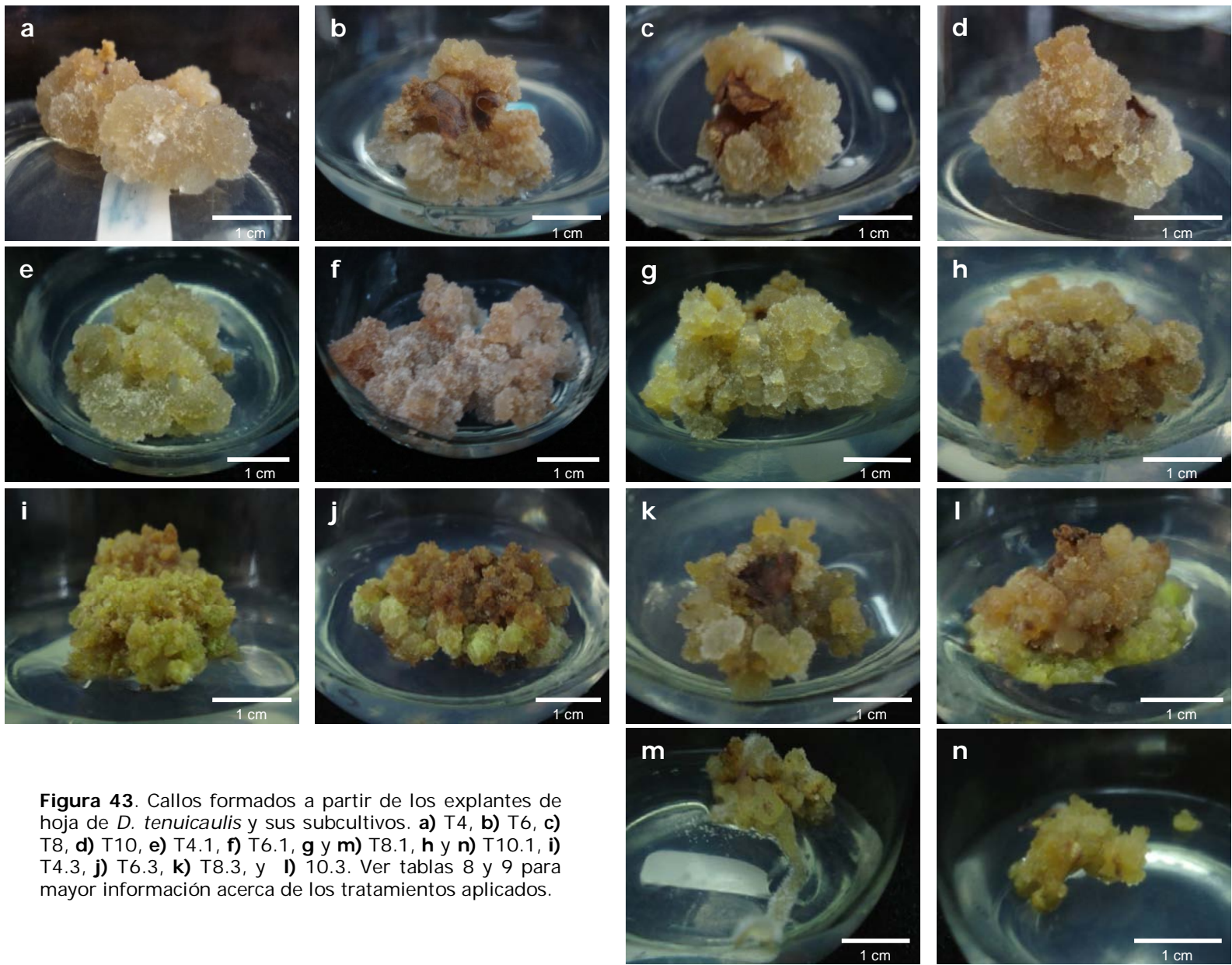
El balance hormonal proporcionado a los explantes de hojas en los tratamientos 4, 6, 8 y 10, permitió la formación de callos de gran biomasa, debido a la regulación positiva que tanto auxinas como citocininas ejercen. Al ser eliminadas las auxinas, que inhiben la formación de clorofilas, y conservarse la aplicación de citocininas, se permitió la formación de zonas fotosintéticas en los callos, mientras que en aquellos subcultivos en donde se eliminaron los fitorreguladores exógenos, se formaron raíces vía indirecta (George *et al.*, 2008), efecto que debió originarse debido a la actividad de las auxinas endógenas que promueven la generación de raíces (Woodward y Bartel, 2005).



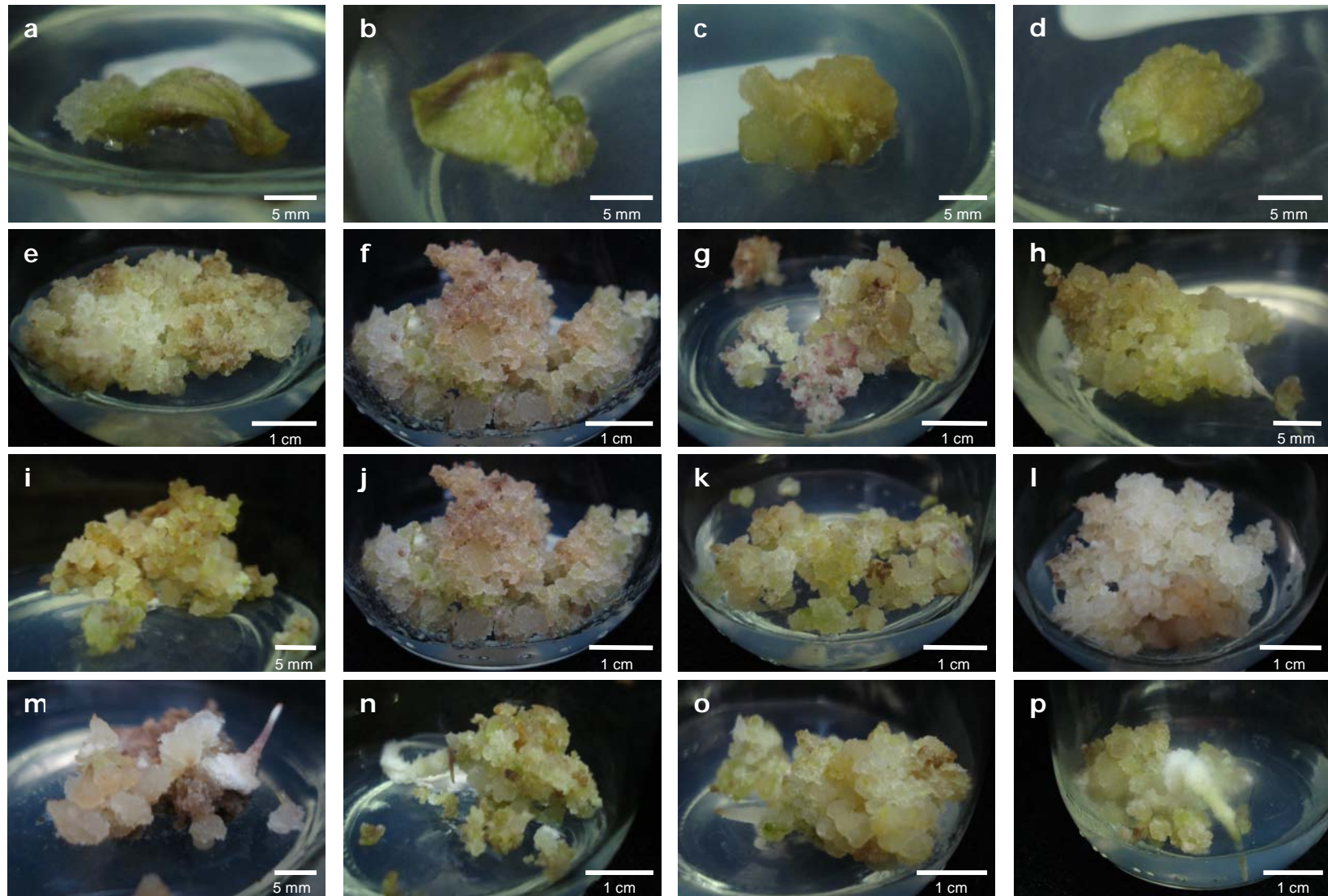
**Figura 41.** Callos provenientes de los tratamientos: **a** y **d**) T2; **b** y **e**) T2.2 (después del subcultivo a medio con auxinas); **c** y **f**) T2.1 (después del subcultivo a medio basal). **a**, **b** y **c**) *D. tenuicaulis*; y **d**, **e**, y **f**) *D. brevis*. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 42.** Callos provenientes de los tratamientos: **a** y **c**) T5; **b**) T3; **d**) T9; **e** y **g**) T5.1; **f**) T3.1; **h** y **i**) T9.1. **a** y **e**) *D. tenuicaulis* **b**, **c**, **d**, **f**, **g** y **h**) *D. brevis*. Ver tablas 8 y 9.



**Figura 43.** Callos formados a partir de los explantes de hoja de *D. tenuicaulis* y sus subcultivos. **a)** T4, **b)** T6, **c)** T8, **d)** T10, **e)** T4.1, **f)** T6.1, **g** y **m)** T8.1, **h** y **n)** T10.1, **i)** T4.3, **j)** T6.3, **k)** T8.3, y **l)** 10.3. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 44.** Callos formados a partir de los explantes de hoja de *D. brevis* y sus subcultivos. **a)** T4, **b)** T6, **c)** T8, **d)** T10, **e y m)** T4.1, **f y n)** T6.1, **g y o)** T8.1, **h y p)** T10.1, **i)** T4.3, **j)** T6.3, **k)** T8.3, y **l)** 10.3. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

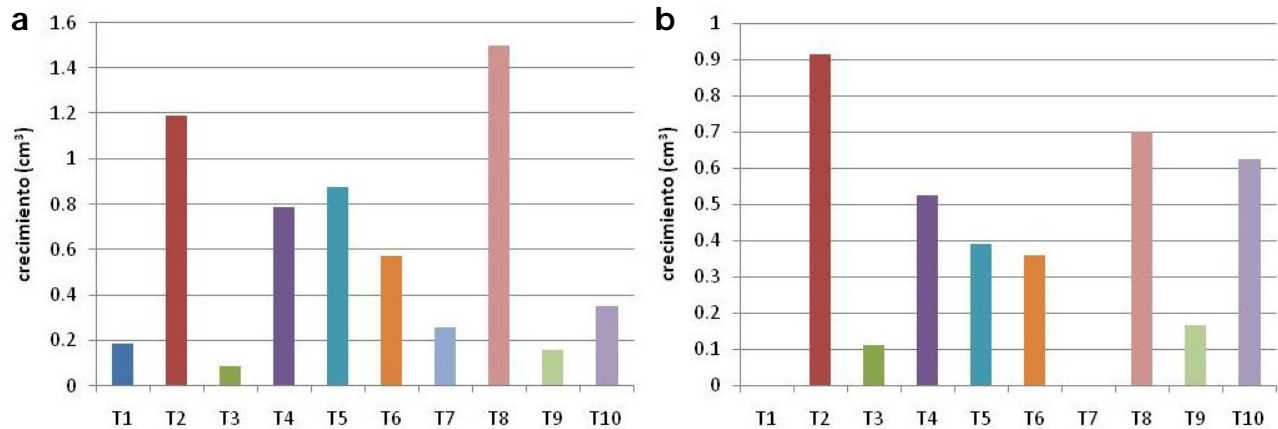
## **Inducción de callo a partir de entrenudos**

Los tratamientos a los cuales fueron sometidos los explantes de entrenudos de *D. tenuicaulis* tuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), siendo los tratamientos 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 10 los que mostraron la mayor formación de callo después de 60 días de cultivo (tabla 21; figura 45a). Los resultados anteriores indican que, al igual que en los explantes de hojas, la combinación de citocininas (BA y Kin) y auxinas (2,4-D) promovieron la mayor formación y crecimiento de los callos (George *et al.*, 2008), sin embargo, en este tipo de explantes, es decir, entrenudos, la aplicación de 2,4-D, BA (2 mg/l) o Kin (0.5 mg/l) por sí mismas, fue suficiente para inducir el crecimiento de células indiferenciadas, respuesta también obtenida en cultivos de entrenudos de *D. imperialis* y *D. excelsa*, mediante la adición de diferentes concentraciones de BA, cinetina y 2iP, en donde BA, en cualquiera de las concentraciones usadas, promovió un mayor crecimiento de callo, (González, 1999). Así, la interacción de los fitorreguladores y las hormonas endógenas es capaz de promover la formación de callo (Cline, 1976).

La respuesta obtenida de los explantes de entrenudos de *D. brevis*, sometidos a diferentes tratamientos, mostró también diferencias significativas, pues fueron los tratamientos 2, 8 y 10, los que lograron la mayor formación de callo después de 60 días de cultivo (tabla 21). Los resultados anteriores indican que el 2,4-D en combinación con la Kin promovió la mayor formación y crecimiento de los callos, siendo únicamente T1 y T7 los que no indujeron su generación (figura 45b), misma respuesta observada en los explantes de hoja. De esta forma, en *D. brevis* no fue necesaria la aplicación externa de ambos fitorreguladores para la formación de callos, pero su balance si es capaz de estimular un mayor crecimiento (George *et al.*, 2008), en relación a los callos cuya estimulación fue inducida por un solo regulador de crecimiento, ya sea auxina o citocinina.

**Tabla 21.** Promedio de formación de callos a partir de explantes de entrenudos de *D. tenuicaulis* y *D. brevis*, después de 60 días de inducción. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el crecimiento y formación de callo ( $p < 0.05$ ), **a** representa los valores mayores y **d** los menores. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Promedios de Crecimiento (cm <sup>3</sup> )			
	<i>D. tenuicaulis</i>		<i>D. brevis</i>	
<b>1</b>	0.18 ± 0.4	c	0 ± 0	e
<b>2</b>	1.19 ± 0.92	a,b	0.92 ± 0.32	a
<b>3</b>	0.09 ± 0.19	c	0.11 ± 0.2	d,e
<b>4</b>	0.76 ± 0.7	a,b,c	0.53 ± 0.15	b,c
<b>5</b>	0.88 ± 0.48	a,b,c	0.39 ± 0.28	b,c,d
<b>6</b>	0.57 ± 0.19	a,b,c	0.36 ± 0.27	c,d
<b>7</b>	0.26 ± 0.23	b,c	0 ± 0	e
<b>8</b>	1.5 ± 0.41	a	0.7 ± 0.26	a,b
<b>9</b>	0.16 ± 0.2	c	0.17 ± 0.43	d,e
<b>10</b>	0.35 ± 0.24	b,c	0.59 ± 0.17	a,b,c

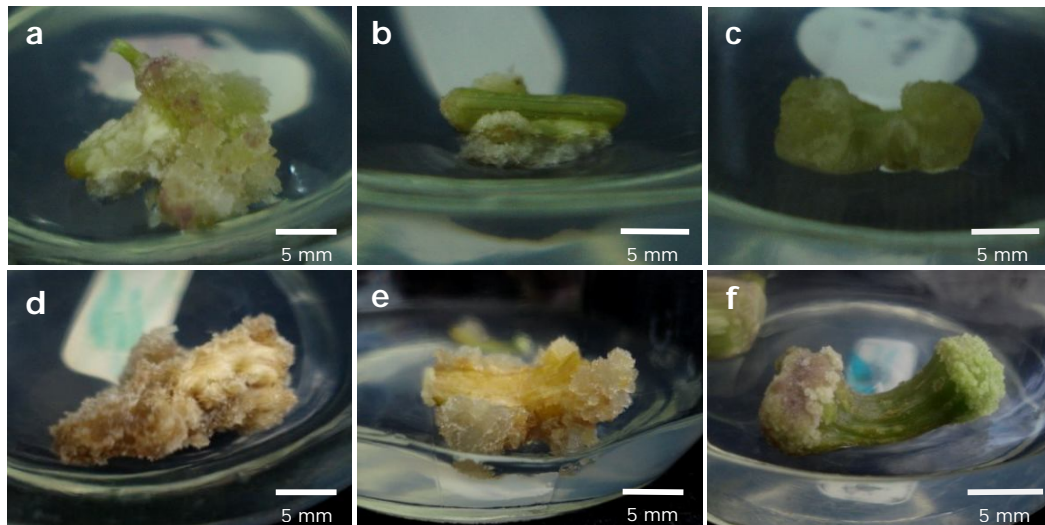


**Figura 45.** Promedio de crecimiento de los callos formados a partir de explantes de entrenudos de *D. tenuicaulis* (a) y *D. brevis* (b), después de 60 días de inducción. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

En el cultivo de entrenudos, al igual que en los explantes de hoja, la integridad del tejido se mantuvo en ambas especies (figuras 46a y d), así, los reguladores de crecimiento promovieron la división celular y la formación de una masa de células indiferenciadas cuyo crecimiento inició en las zonas de corte o



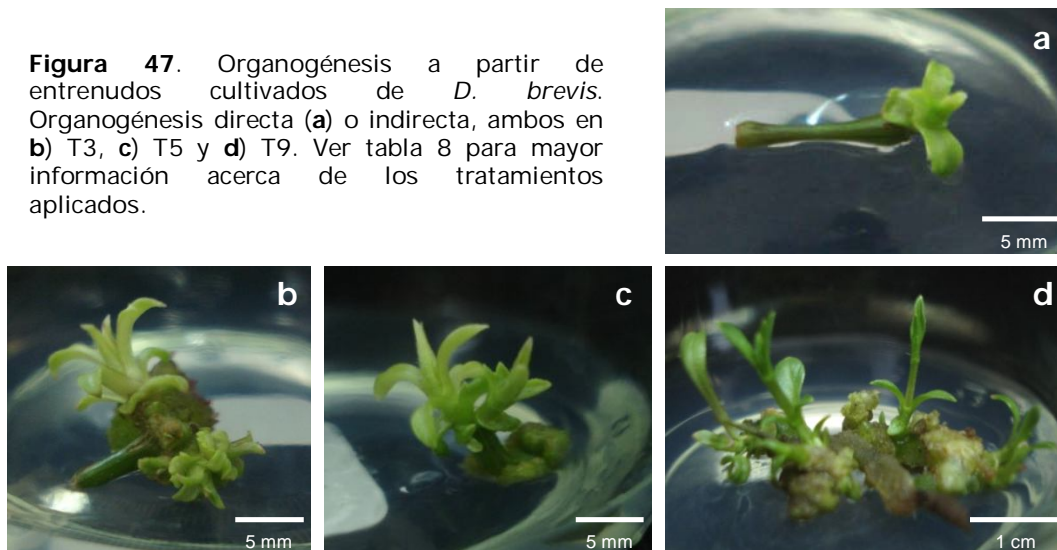
extremos de los explantes (figura 46b y e), o bien, en la zona de contacto con el medio de cultivo, extendiéndose hacia la superficie del explante, (figuras 46c y f).



**Figura 46.** Los tratamientos utilizados para la inducción de callo a partir de entrenudos, mantuvieron al tejido íntegro, de forma que no hubo desdiferenciación celular (**a** y **d**), iniciando el crecimiento a partir de la base de los entrenudos (**b** y **e**), o bien, a partir de las zonas de corte (**c** y **f**). **a**, **b** y **c** corresponden a *D. tenuicaulis*, **d**, **e** y **f**, a *D. brevis*. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

Al igual que en los explantes de hoja, en *D. brevis*, los tratamientos 3, 5 y 9, formaron brotes, sin embargo en los entrenudos la organogénesis fue directa e indirecta (figura 47a). T3 formó brotes en el 66.66% de los explantes, T5 en el 30% y T9 en el 8.5%, éstos (figuras 47b, c y d), como respuesta a las citocininas contenidas en el medio de cultivo y que promueven la formación de brotes a partir de callos generados *in vitro* o de los explantes cultivados (Woodward y Bartel, 2005). En este explante, la BA en bajas concentraciones (0.5 mg/l) tuvo un mayor efecto, mientras que en los explantes de hoja, las concentraciones altas (2mg/l) fomentaron una mayor formación de brotes, siendo la Kin menos efectiva en ambos explantes. De esta forma, fue evidente que la respuesta ante la presencia de reguladores de crecimiento u hormonas, fue heterogénea entre los diferentes tejidos y células, y que pudo deberse a la presencia de receptores específicos en cada blanco (Kakimoto, 2003).

**Figura 47.** Organogénesis a partir de entrenudos cultivados de *D. brevis*. Organogénesis directa (a) o indirecta, ambos en b) T3, c) T5 y d) T9. Ver tabla 8 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



Los tratamientos que formaron callos y en suficiente volumen para hacer el análisis estadístico, se sometieron a diferentes medios para evaluar su crecimiento y promover la organogénesis, realizándose el subcultivo a tres o dos diferentes medios de cultivo, de acuerdo al medio de origen y como fue considerado en el método (tabla 9). Los tratamientos considerados para el análisis estadístico en esta etapa fueron: T2, T4, T5, T7, T8 y T10, de *D. tenuicaulis*; y T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9 y T10 de *D. brevis*. El subcultivo de T1 y T6 provocó la oxidación del 50% de los callos de *D. tenuicaulis*, por lo cual no se realizó, en este tratamiento, el análisis estadístico en comparación con el resto, sin embargo la curva de crecimiento y las respuestas morfogénicas fueron evaluadas.

En el tratamiento 2 de *D. tenuicaulis*, sometido a dos subcultivos: medio basal y 2,4-D 0.5 mg/l, fue notable que después de los 15 días de cultivo, hubo un mayor crecimiento en el medio basal ( $p < 0.05$ ), diferencia significativa que se conservó en los siguientes periodos (figura 48a), indicando que el mantenimiento de la concentración de auxinas en el medio ejerció una actividad inhibitoria en el proceso de división celular, mientras que el nivel endógeno de citocininas y auxinas del callo subcultivado a medio basal fue capaz de promover la continua citocinesis, permitiendo el balance necesario en ambas que regule positivamente

los cambios en la tasa de división celular (Kepinski y Leyser, 2002; George *et al.*, 2008).

En los subcultivos realizados para T5 y T7 de *D. tenuicaulis*, en donde se mantuvo la concentración de citocininas, T5.2 (BA 2 mg/l) y T.7 (Kin 0.5 mg/l), se observó un mayor crecimiento con respecto a los subcultivos a medio basal (T5.1 y T 7.1;  $p < 0.05$ ), diferencia que en ambos, se hizo evidente después de los 45 días de cultivo (figuras 49b y c). Lo anterior debido a la presencia de BA y Kin que inducen la proliferación celular (Hutchinson y Kieber, 2002).

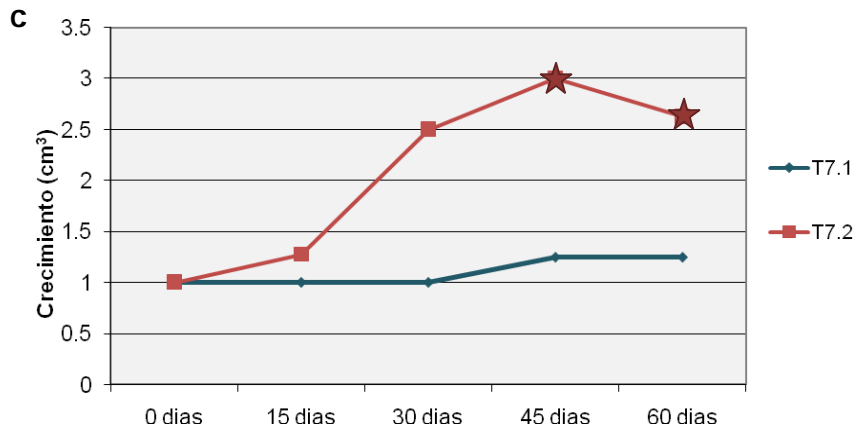
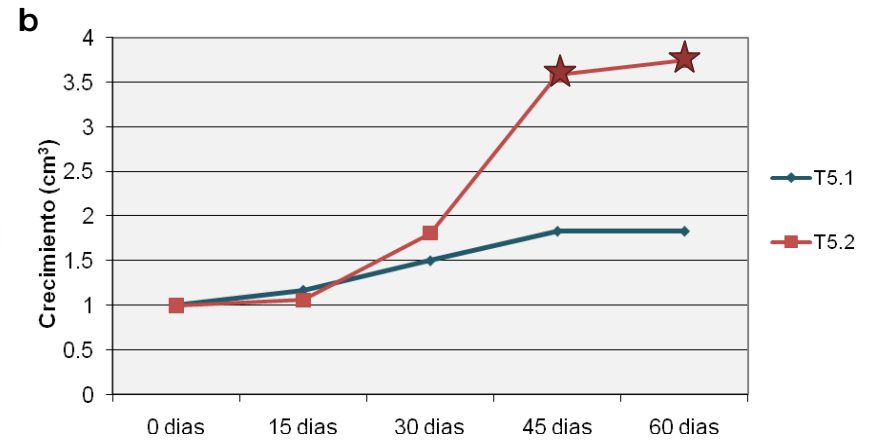
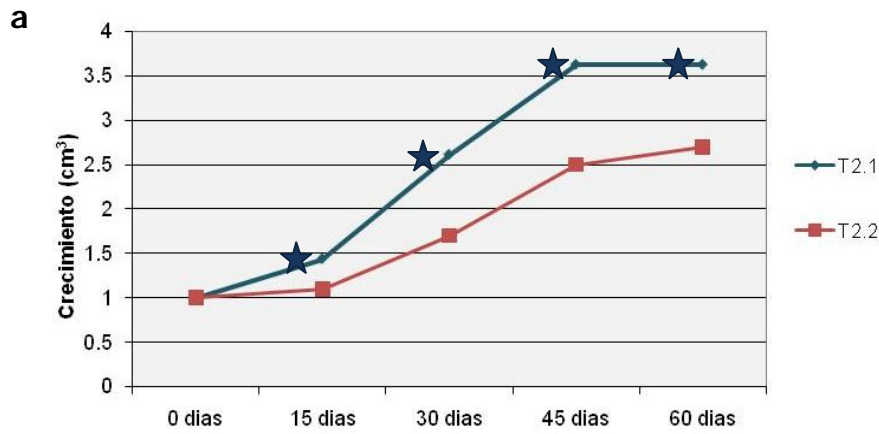
Para los demás subcultivos analizados, igual que en los subcultivos de callos provenientes de hojas, se presentó un crecimiento inicial homogéneo, generándose, después de 30 días de cultivo, diferencias significativas únicamente en el tratamiento T4.3, (figura 49a), en relación a los subcultivos realizados a medio basal (T4.1) y medio de origen (T4.2). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los callos en los subcultivos de T8 y T10, a pesar de lo cual, hubo una tendencia hacia un mayor aumento de biomasa en T8.3 y T10.3 (figuras 49b y c), por lo que es probable que dicha diferencia en el crecimiento se presente en un tiempo posterior. Estos resultados nos confirman que BA fue más potente que Kin al inducir un aumento en la tasa de proliferación celular, aunque la presencia de ambas citocininas induce la división celular (Hutchinson y Kieber, 2002).

A diferencia de los resultados obtenidos en los subcultivos de callos provenientes de hojas de *D. tenuicaulis*, la presencia de las auxinas exógenas en los subcultivos de entrenudos regularon negativamente la división celular, inhibiendo el crecimiento de los callos, así, en aquellos tratamientos en donde se conservó su aplicación externa (T2.2, T4.2, T8.2 y T10.2), hubo un menor aumento en la biomasa en relación a aquellos en donde se eliminaron las auxinas (T2.1) y se conservaron las citocininas (T4.1, T8.3 y T10.3).

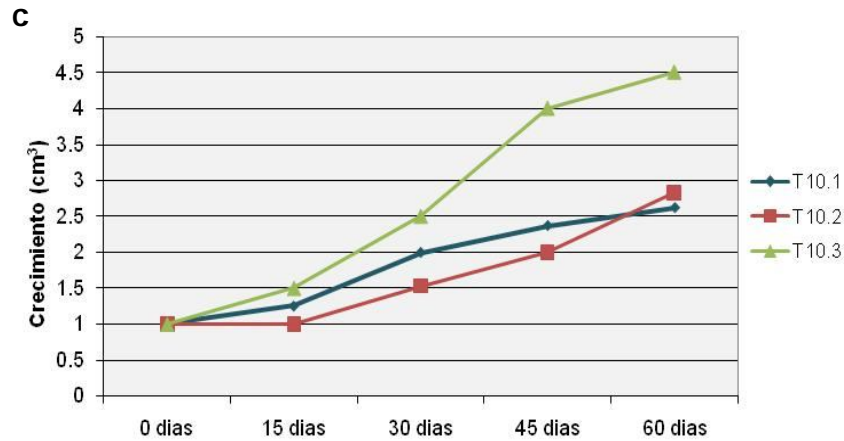
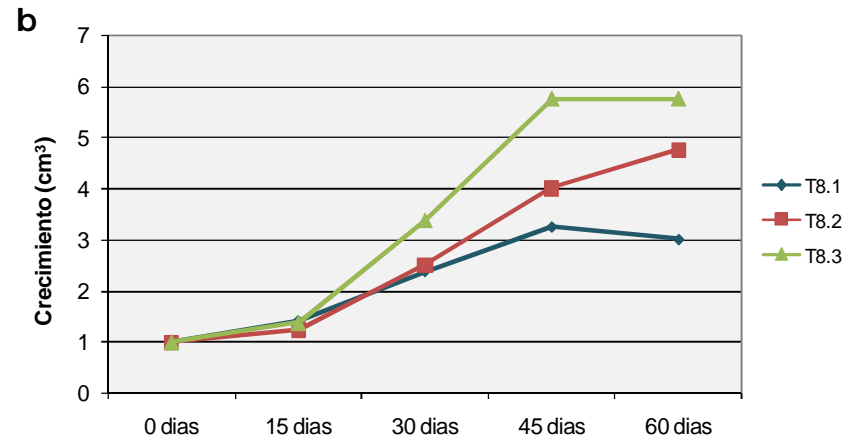
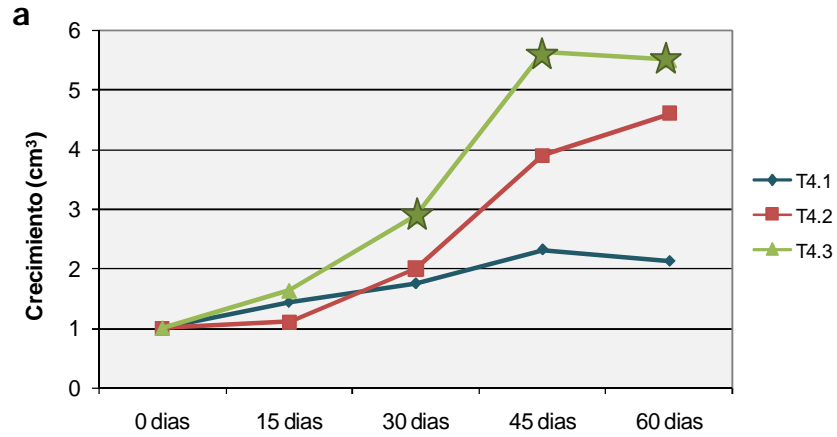
Por otra parte, en los subcultivos de los tratamientos 2, 3, 5 y 9, de *D. brevis*, no hubo diferencias significativas en el crecimiento de los callos. Sin embargo, al analizar la curva de crecimiento, se presentó una tendencia hacia la diferenciación en la formación de biomasa. En los subcultivos del tratamiento 2, la curva de T2.1 se ubica sobre la de T2.2 (figura 50a), evento que probablemente se debió a la eliminación de auxinas exógenas y que permitió establecer el balance adecuado que promovió la división celular, pues al establecer la relación entre la concentración de los fitorreguladores y su actividad, es común encontrar que las altas concentraciones de auxinas son inhibitorias debido al aumento en la producción de etileno que éstas generan (George *et al.*, 2008). Así mismo, las curvas de los tratamientos T3.2, T5.2 y T9.2, en donde se conservaron las citocininas, se ubican por encima de T3.1, T5.1 y T9.1, que fueron subcultivados a medio basal (figuras 50b, c y d), ya que éstas inducen la proliferación celular (Hutchinson y Kieber, 2002). Es probable que en un periodo posterior a los 60 días de cultivo, la diferencia significativa en el crecimiento de los callos, se presente.

Al evaluar el crecimiento de los callos de T4, 6, 8 y 10, como en el resto de los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas, pero fue evidente que las curvas de crecimiento de aquellos en donde se mantuvo la aplicación de BA y cinetina (T4.2, T4.3, T6.2, T6.3, T8.3, T10.2 y T10.3), se ubicaron por encima de aquellos que fueron subcultivados a medio basal (T4.1, T6.1, T8.1, y T10.1), evidenciando nuevamente el efecto positivo que tienen las citocininas sobre la división celular (figura 51).

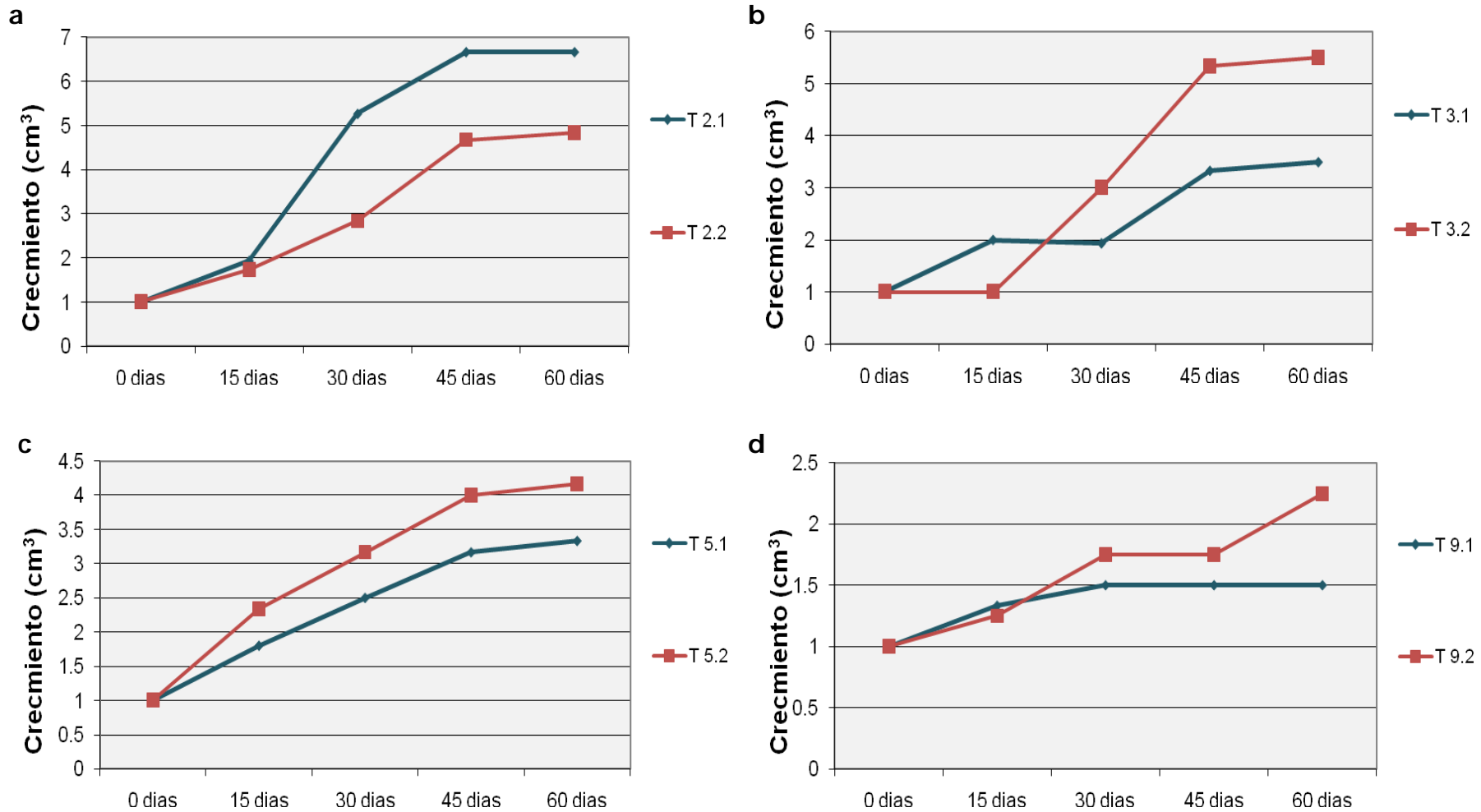
Al igual que los callos provenientes de hojas, se observó una tendencia de crecimiento con tres etapas: inducción de la división celular, división celular activa, y disminución y finalización de la división celular (George *et al.*, 2008). La oxidación y el descenso del crecimiento de los callos después de 45 días, hizo recomendable un subcultivo que permitiera la continuidad de su crecimiento.



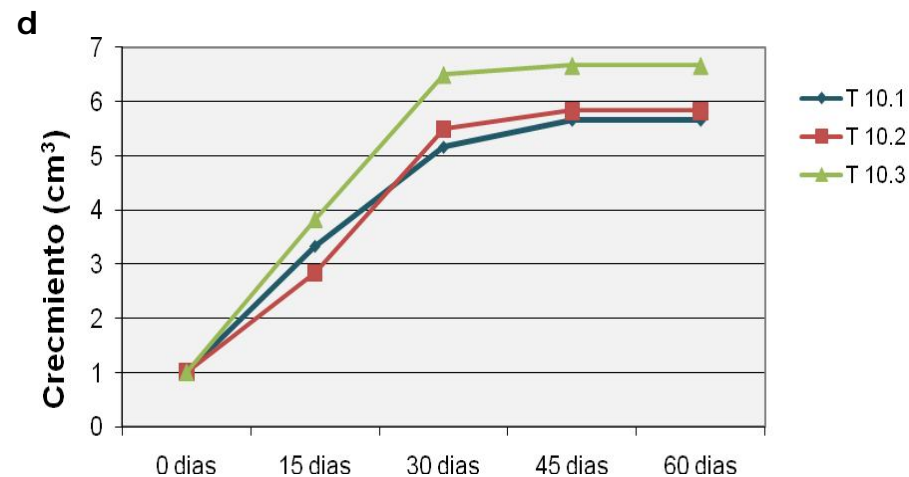
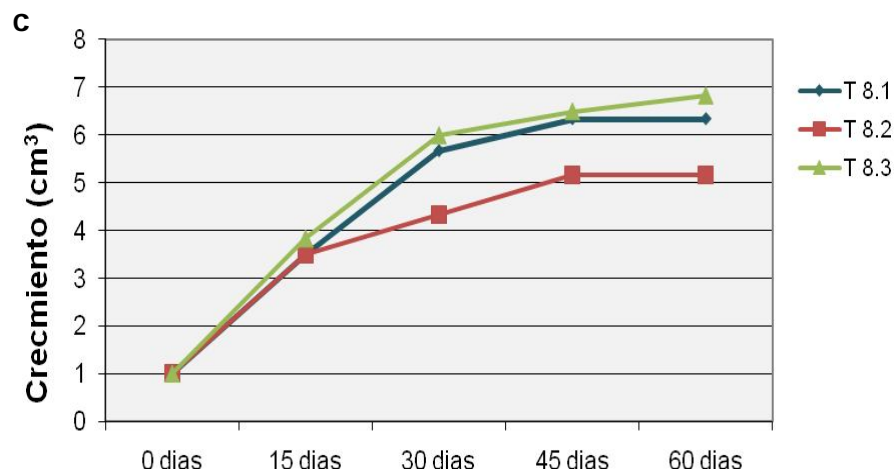
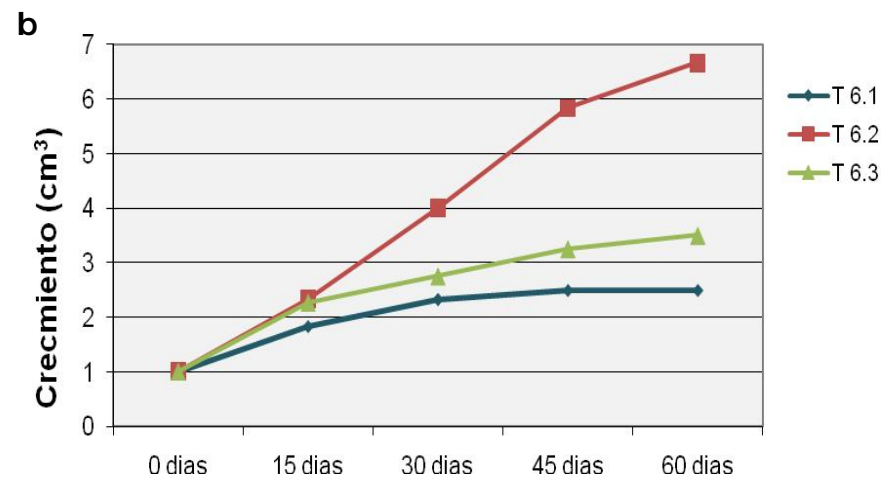
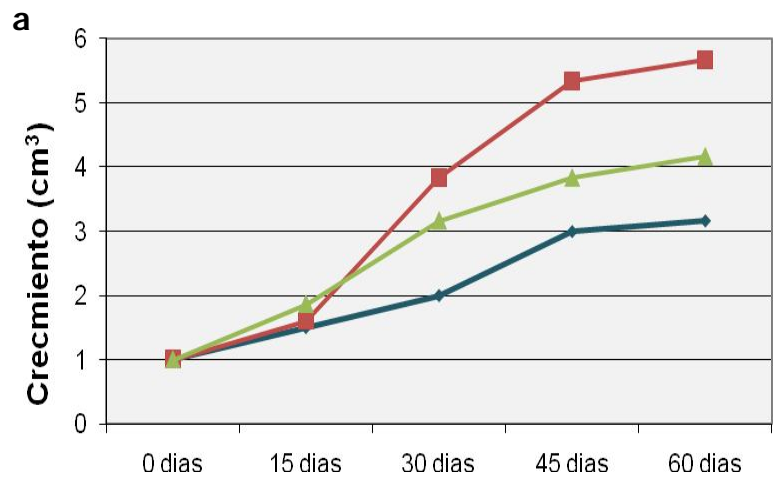
**Figura 48.** Curvas de crecimiento de los callos obtenidos a partir de tallos de *D. tenuicaulis*. **a)** El tratamiento 2.1 tuvo mayor crecimiento respecto al 2.2 debido a la actividad inhibitoria de las auxinas exógenas. **b)** En los subcultivos que provenían del tratamiento 5, se observó mayor crecimiento en el medio que contenía BA (5.2), debido a la actividad inductora que ésta ejerce sobre la división celular, efecto que también se observó en **c)**, en donde, el crecimiento fue mucho mayor en los subcultivos que contenían Kin (0.5 g/l). Las estrellas indican diferencias significativas en el volumen de los callos en el periodo de tiempo señalado. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 49.** Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de *D. tenuicaulis*, sometidos a subcultivo. En T4.3, donde se eliminaron las auxinas, pero se conservó la aplicación de citocininas (BA 0.5 mg/l), se presentó un mayor crecimiento que se hizo evidente después de los 30 días de subcultivo, mientras que para aquellos que poseían Kin, es decir T8.2, T8.3, T10.2 y T10.3, esta diferencia en crecimiento no se presentó respecto a los callos subcultivados a medio basal T8.1 y T10.1 (b y c). Las estrellas indican diferencias significativas en el volumen de los callos en el periodo de tiempo señalado. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 50.** Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de *D. brevis*, sometidos a subcultivo. No hubo diferencias significativas en el crecimiento de los callos, sin embargo, hubo una tendencia hacia la diferenciación en la formación de mayor biomasa en T2.1, en donde se eliminó la aplicación externa de auxinas, y T3.2, T5.2 y T9.2, que mantuvieron la misma concentración de citocininas presente en el medio de origen. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 51.** Curvas de crecimiento para los callos obtenidos a partir de entrenudos de *D. brevis*, sometidos a subcultivo. No hubo diferencias significativas en el crecimiento de los callos, sin embargo, en aquellos tratamientos en donde se mantuvo la inducción por BA (T 4.2, T 4.3, T 6.2 y T 6.3), o Kin (T 8.3, T 10.2 y T 10.3), la formación de biomasa pareció incrementarse. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



Los tratamientos provenientes de T2, es decir, T2.1 y T2.2, en *D. tenuicaulis*, formaron callos friables, translúcidos con coloración café en tonos claros y medios (figuras 52a), sin embargo en los callos de T2.2 se observaron diversos puntos color amarillo intenso en la base de los mismos (figuras 52b). Lo anterior probablemente debido a la actividad de las auxinas exógenas que inducen la división y dispersión de las células, además de inhibir el desarrollo de cloroplastos (George *et al.*, 2008). En el 55.5% de los callos subcultivados a medio basal (T2.1) se formaron raíces gruesas, en un principio verdes, y con abundantes pelos radicales (figura 52c). En una de estas repeticiones, las raíces formaron sobre ellas un tejido translúcido altamente hidratado (figura 52d). Las auxinas son fitorreguladores ampliamente utilizados en CTV, ya que promueven la generación de raíces en callo mediante la diferenciación de meristemos (Pasternak *et al.*, 2005).

En *D. brevis*, los callos formados por T2 y los subcultivos de estos, fueron friables, translúcidos y de color amarillo tenue (figura 52e), aparecieron zonas cafés en diferentes tonos después del subcultivo (figura 52f). Lo anterior debido a la promoción de la segregación celular e inhibición de la formación de cloroplastos por parte de las auxinas (George *et al.*, 2008), al igual que en *D. tenuicaulis*, sin embargo éstos no fueron organogénicos.

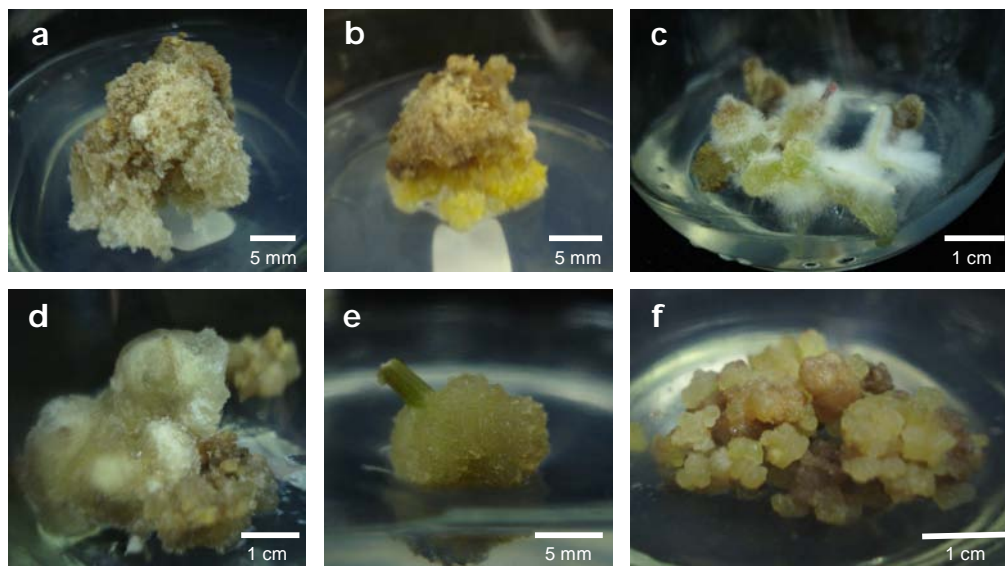
Los callos formados a partir de los tratamientos 1, 3, 5, 7 y 9 de *D. tenuicaulis*, se tornaron densos y opacos con una coloración verde clara y oscura, mostrando en su mayoría tonos púrpura en el ápice (figuras 53a, b, c, d y e). Posterior al subcultivo, los callos se oxidaron, tornándose color café en algunas zonas (figuras 53f, g, h, i y j). La apariencia de estos callos se debió a la inducción ejercida por las citocininas endógenas, en T1, y las exógenas en 3, 5, 7 y 9, que promovieron la generación de callos densos y fotosintéticos al inducir la agregación celular y el desarrollo de clorofilas (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003; George *et al.*, 2008).

En *D. brevis*, los callos formados en los tratamientos 3, 5 y 9, fueron densos, translúcidos y opacos en otras zonas, y de color verde intenso (figuras 53k, l y m), que al subcultivarse mantuvieron la misma densidad, aunque presentan áreas cafés y rojizas (figura 53n, o y p). T3, 5 y 9 formaron abundantes brotes desde el primer periodo del cultivo, actividad que se mantuvo en los subcultivos, aun al eliminar las hormonas del medio, evidencia de que el impulso inicial de las citocininas promueve la organogénesis de brotes y la producción de auxinas, manteniendo un balance que permite el crecimiento de los brotes generados (Woodward y Bartel, 2005; George *et al.*, 2008).

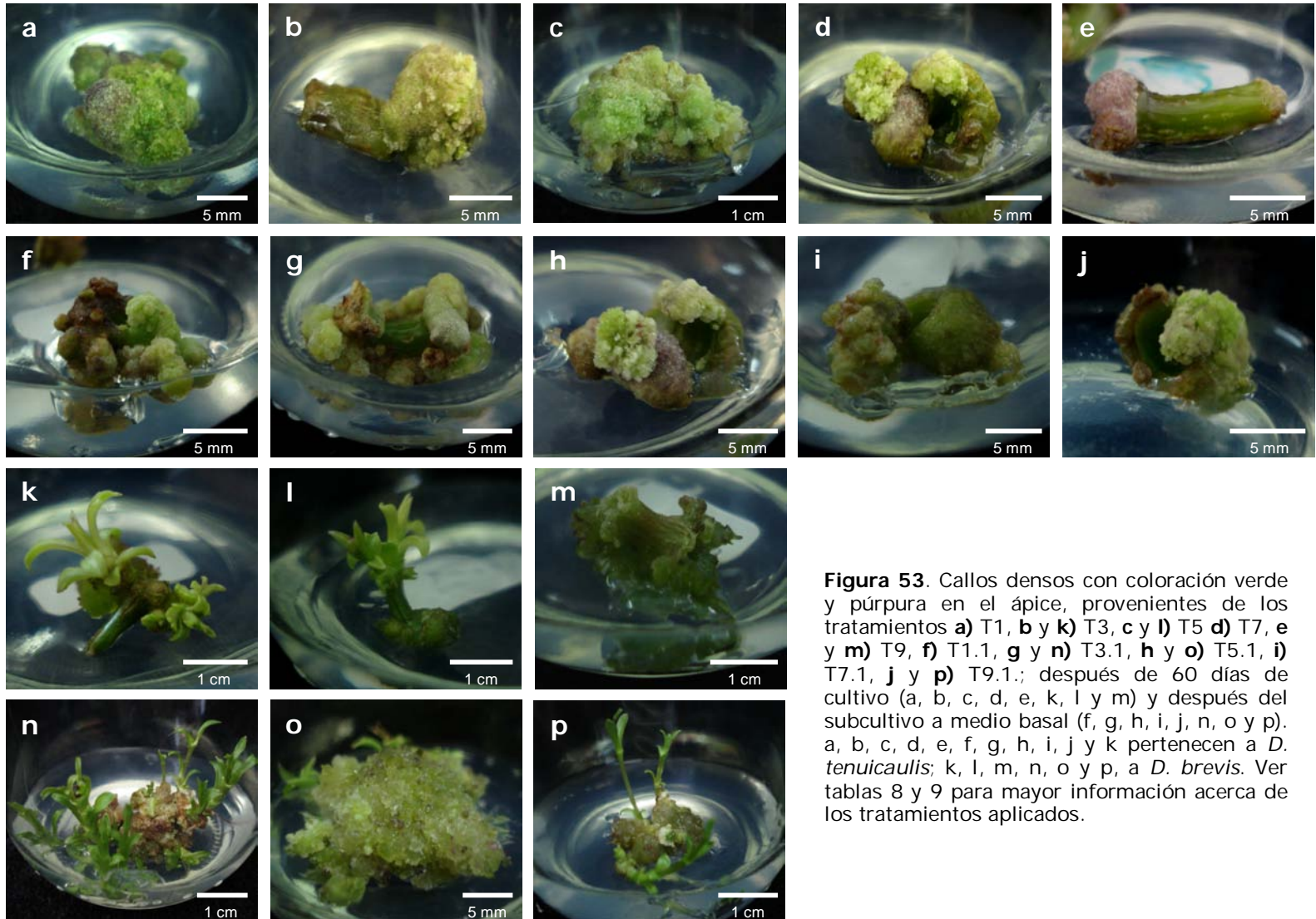
Los callos de los tratamientos 4, 6, 8 y 10 de *D. tenuicaulis* fueron friables, translúcidos de color amarillo y café tenue (figuras 54a, b, c y d), tornándose, después del subcultivo, color amarillo en zonas, pero café oscuro, medio y claro en otras, en los subcultivos a medio basal y medio original (figuras 54e, f, g y h), mientras que los callos subcultivados al medio de cultivo únicamente con citocininas adquirieron una coloración opaca café en el ápice, y amarillo-verdosa en la base (figuras 54i, j, k y l). La formación de raíces se presentó en todos estos tratamientos, en aproximadamente el 22.7-28% de las repeticiones, sin embargo fue en los subcultivos a medio basal en donde se observó mayor crecimiento (figuras 54m y n).

Los tratamientos 4, 6, 8, y 10 de *D. brevis* (figuras 55a, b, c y d), así como los subcultivos al medio original y basal, tuvieron respuestas similares, siendo todos friables y translúcidos, de color amarillo tenue, con una tonalidad ligeramente verde (figuras 55e, f, g y h). Al subcultivarse al medio con citocininas algunas zonas se tornaron cafés en diferentes tonalidades y con algunos puntos rojos (figuras 55i, j, k y l). No hubo formación de brotes, pero en los tratamientos 4.1, 6.1, 8.1 y 10.1 (subcultivos a medio basal), se formaron raíces (figuras 55m, n, o y p).

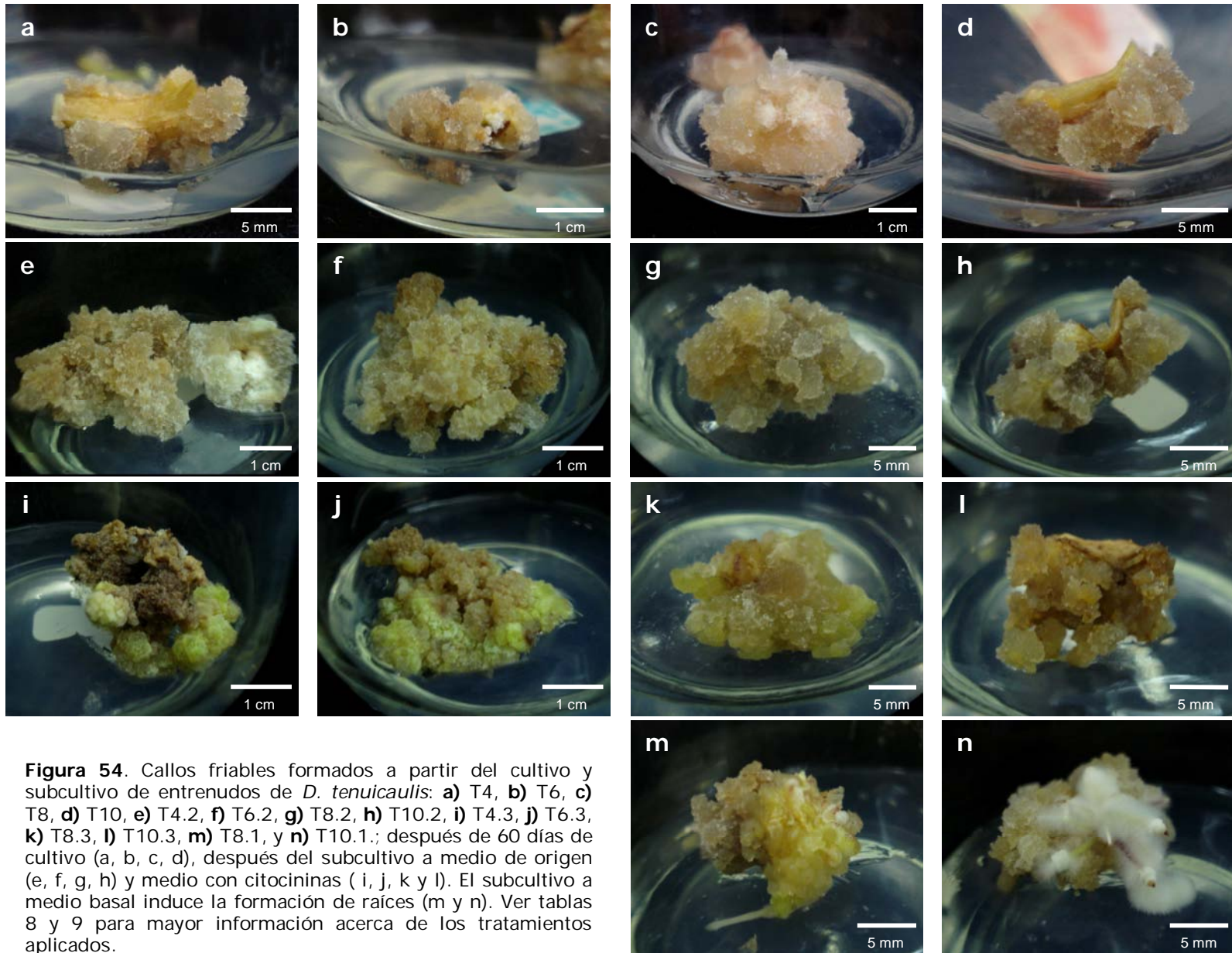
Al igual que en los explantes de hojas, las concentraciones contenidas en el medio de cultivo, brindaron un balance auxina/citocinina, que en los tratamientos 4, 6, 8 y 10, promovió la formación de callos abundantes. En los subcultivos a medio basal, se formaron raíces vía indirecta, probablemente debido a la concentración interna de auxinas que inducen la formación de raíces a partir de la previa generación de meristemas (Pasternak *et al.*, 2005; Woodward y Bartel, 2005).



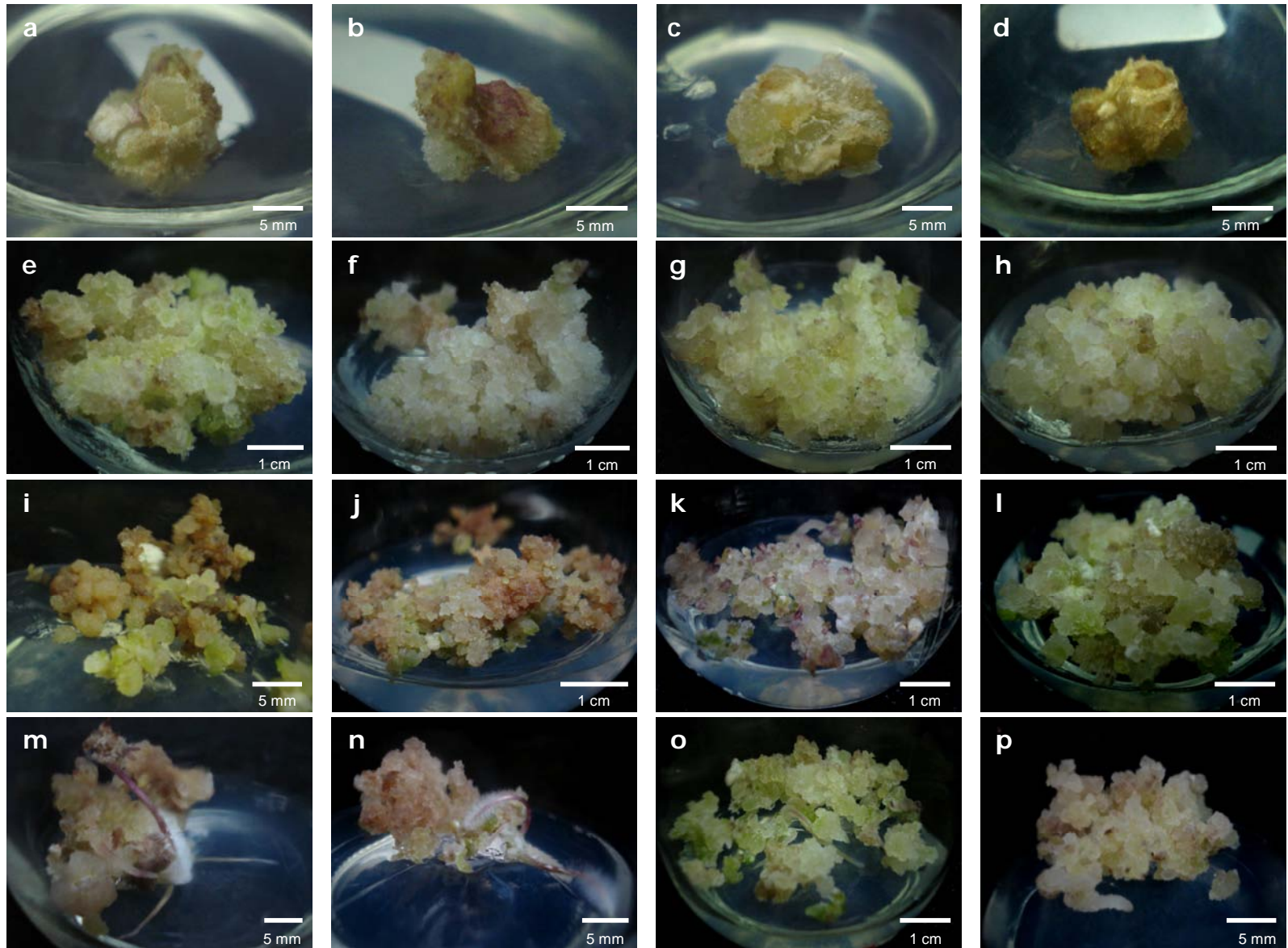
**Figura 52.** Callos provenientes de los tratamientos: **a, c, y d)** T2.1, **b y f)** T2.2, y **e)** T2. **a, b y c)** *D. tenuicaulis*, **d, e y f)** *D. brevis*. Algunos de los callos de T2.1 de *D. tenuicaulis* formaron raíces gruesas con abundantes pelos radicales (**c**), uno de los cultivos formó sobre la raíces un tejido translúcido altamente hidratado (**d**). Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 53.** Callos densos con coloración verde y púrpura en el ápice, provenientes de los tratamientos **a)** T1, **b) y k)** T3, **c) y l)** T5 **d)** T7, **e) y m)** T9, **f)** T1.1, **g) y n)** T3.1, **h) y o)** T5.1, **i)** T7.1, **j) y p)** T9.1.; después de 60 días de cultivo (**a, b, c, d, e, k, l y m**) y después del subcultivo a medio basal (**f, g, h, i, j, n, o y p**). **a, b, c, d, e, f, g, h, i, j y k** pertenecen a *D. tenuicaulis*; **k, l, m, n, o y p**, a *D. brevis*. Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 54.** Callos friables formados a partir del cultivo y subcultivo de entrenudos de *D. tenuicaulis*: **a)** T4, **b)** T6, **c)** T8, **d)** T10, **e)** T4.2, **f)** T6.2, **g)** T8.2, **h)** T10.2, **i)** T4.3, **j)** T6.3, **k)** T8.3, **l)** T10.3, **m)** T8.1, y **n)** T10.1.; después de 60 días de cultivo (a, b, c, d), después del subcultivo a medio de origen (e, f, g, h) y medio con citocininas ( i, j, k y l). El subcultivo a medio basal induce la formación de raíces (m y n). Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.



**Figura 55.** Callos friables formados a partir del cultivo y subcultivo de entrenudos de *D. brevis*: **a)** T4, **b)** T6, **c)** T8, **d)** T10, **e)** T4.2, **f)** T6.2, **g)** T8.2, **h)** T10.2, **i)** T4.3, **j)** T6.3, **k)** T8.3, **l)** T10.3, **m)** T4.1, **n)** T6.1, **o)** T8.1, y **p)** T10.1; después de 60 días de cultivo (a, b, c, d), después del subcultivo a medio de origen (e, f, g, h) y medio con citocininas ( i, j, k y l). El subcultivo a medio basal induce la formación de raíces (m, n, o y p). Ver tablas 8 y 9 para mayor información acerca de los tratamientos aplicados.

## Evaluación del efecto de auxinas y de carbón activado sobre la formación de raíces

Al realizar los cultivos de brotes en cuatro diferentes tratamientos para inducir su enraizamiento, evaluamos las diferencias en el desarrollo de las raíces, registrando el número, longitud, grosor, color y morfología de éstas.

Las diferencias en el número de raíces formadas en *D. tenuicaulis*, se hicieron evidentes después de 15 días de cultivo (tabla 22a), mostrando el mayor crecimiento en T3, que contenía la mayor concentración de AIA (2 mg/l), seguido por T4 (AIA 0.5 mg/l), mientras que T1 y T2, que no tuvieron hormonas, formaron la menor cantidad de raíces, respuesta que se conservó después de 30 días de cultivo (figura 57).

En *D. brevis*, se observó el mismo patrón en el número de raíces generadas, siendo T3 el que formó la mayor cantidad, reduciendo el valor en T4, seguido por T1 y T2, que no favorecieron su formación (tabla 22b). Sin embargo, estas diferencias se presentaron después de 30 días de cultivo, por lo cual, en *D. brevis* fue necesario un mayor tiempo de inducción (figura 58).

Los resultados anteriores indican que hubo una relación proporcional en cuanto al número de raíces formadas y la concentración de auxinas, en donde, el aumento en la concentración exógena de ácido indol-acético (AIA), aumentó a su vez el número de raíces formadas.

En *D. tenuicaulis*, la longitud fue mayor en los tratamientos que no contenían hormonas después de 15 días de cultivo, es decir, en T1 (medio basal) y T2 (carbón activado 1 mg/l), a diferencia de los tratamientos con auxinas, T3 y T4, cuya longitud fue menor (tabla 22a). Después de 30 días de cultivo, T1 mantuvo el

mayor crecimiento, sin embargo, T2 lo redujo, alcanzando valores similares a T3 y T4, por lo cual, la presencia continua de carbón activado, inhibe el crecimiento en longitud de raíces (figura 57).

En *D. brevis*, la longitud de las raíces fue estimulada inicialmente por las hormonas endógenas, pues T1, que no contenía fitorreguladores en el medio de cultivo, obtuvo un mayor crecimiento, sugiriendo que T2, T3 y T4, es decir, las auxinas y el carbón activado, ejercieron una actividad inhibitoria sobre el crecimiento en longitud de las raíces (tabla 22b, figura 58).

En *D. tenuicaulis*, el grosor de las raíces permaneció homogéneo durante los 30 días de monitoreo, por lo que las auxinas y el carbón activado no tuvieron ningún efecto sobre este parámetro (tabla 22a), sin embargo en *D. brevis*, el grosor de las raíces fue mayor en T4, siendo, la aplicación del ácido indolacético (AIA) en bajas concentraciones (0.5 mg/l), la responsable de estimular inicialmente este evento, ya que después de 30 días el parámetro se homogenizó completamente (tabla 22b).

En *D. tenuicaulis*, todas las raíces fueron blancas, aunque presentaron pigmentación verde en la base, y formaron gran cantidad de pelos radicales (figuras 57). Las raíces generadas en los tratamientos sin hormonas, tuvieron una gran cantidad de ramificaciones (figuras 57a, b, c, d, e y f), mientras que aquellas formadas en el medio adicionado con AIA en cualquier concentración, no se ramificaron inicialmente (figuras 57g, h, i, j, k y l).

Las raíces generadas en los brotes de *D. brevis*, formaron gran cantidad de pelos radicales (figuras 58), al igual que en *D. tenuicaulis*, no obstante, las generadas en T1 y T2 fueron verdes y poco ramificadas (figuras 58a, b, c y d),



mientras que aquellas producidas en T3 y T4 presentaron una coloración rojiza y verde en el ápice, y no se ramificaron (figuras 58a, b, c y d).

De acuerdo a los resultados descritos anteriormente, el efecto de las auxinas exógenas fueron similares en ambas especies, diferenciándose únicamente debido a la formación previa de callo en la base de algunos brotes de *D. tenuicaulis*, por lo que en esta especie, la organogénesis de las raíces se llevó a cabo de forma directa o indirecta (figura 56). Las auxinas inducen la desdiferenciación celular y comienzan el proceso de proliferación celular, regulando también la tasa de división necesarias para la formación de los callos (Leyser, 2002; George *et al.*, 2008). En *D. brevis*, la organogénesis fue directa, y al igual que en *D. tenuicaulis*, el AIA incrementó la producción adventicia de raíces debido a la promoción que ésta ejerce en la formación de meristemas de *novo*, posterior a la diferenciación de células del periciclo en el tallo (Pasternak *et al.*, 2005; Woodward y Bartel, 2005), ya que las auxinas inducen también la diferenciación celular, teniendo una actividad imprescindible en la formación del sistema vascular, tanto de las raíces, como de los brotes (Leyser, 2002).

Las respuestas de *D. tenuicaulis* y *D. brevis* fueron consistentes con los resultados obtenidos previamente, ya que Mullin y Schlegel (1978) cultivaron meristemas apicales de *Dahlia pinnata* Cav., aplicando AIA, o bien, en combinación con citocininas, pero éstas, en muy baja concentración en relación a la de la auxina, a pesar de lo cual lograron que únicamente 19 de 102 meristemas crecieran hasta formar una planta completa, mientras que Wang y colaboradores (1988) lograron el enraizamiento de 40-92% de los brotes obtenidos a partir de meristemas apicales y yemas axilares cultivados de la misma especie, mediante la aplicación de ANA, carbón activado, IBA e IPA, logrando así aumentar considerablemente la proporción de plantas enraizadas. Hernández (1993) por su parte, reportó el enraizamiento de 18.6-41% de los brotes cultivados en presencia de AIA, y concluyó que hubo una relación directa entre el aumento en la

concentración de éste y el aumento en la longitud del brote y la presencia de raíces después de un mes de cultivo. En este estudio, la relación entre la concentración de AIA y el número de raíces también ha sido confirmada, sin embargo, estas se generaron en 15 días, por lo cual, en comparación con *D. pinnata*, en *D. tenuicaulis* y *D. brevis*, la respuesta requiere de un menor tiempo de inducción, al igual en *D. imperialis* y *D. excelsa*, ambas arborescentes, en las cuales, González (1999, logró el enraizamiento del 60% de los brotes mediante la aplicación de 0.5 mg AIA.

De esta forma, las auxinas son capaces de aumentar el número de raíces generadas, sin embargo, inhiben su elongación, ejerciendo así una regulación positiva en la elongación los brotes, pero negativa en las raíces. El IBA, ha demostrado ser más eficiente, en este ámbito, pues promueve la formación de raíces laterales en concentraciones que inhiben de forma mínima su elongación, aunque se ha comprobado que dentro de la planta es convertido en AIA (Woodward y Bartel, 2005).

Aunque la adición de citocininas debe ser omitida durante la etapa III de micropropagación, pues inhibe la formación de raíces, (George *et al.*, 2008), se encuentran en pequeñas concentraciones debido a su síntesis en el ápice de las raíces recién generadas, lo cual permite aumentar la masa total del sistema radical mediante su ramificación continua, pues en esta hormona, la regulación es positiva en el meristemo radical, postulándose que es negativa en la parte aérea (Kakimoto, 2003). Las auxinas inhiben la biosíntesis de citocininas (Woodward y Bartel, 2005), razón por la cual, en aquellos tratamientos en donde se aplicó AIA, no hubo ramificación de las raíces adventicias, mientras que en las regiones apicales cultivadas en medio basal o carbón activado, las raíces fueron ramificadas, efecto antes observado en los cultivos de *D. imperialis* y *D. excelsa* en donde la adición de carbón activado formó raíces más delgadas pero más ramificadas (González, 1999). La influencia positiva en el grosor de las raíces de

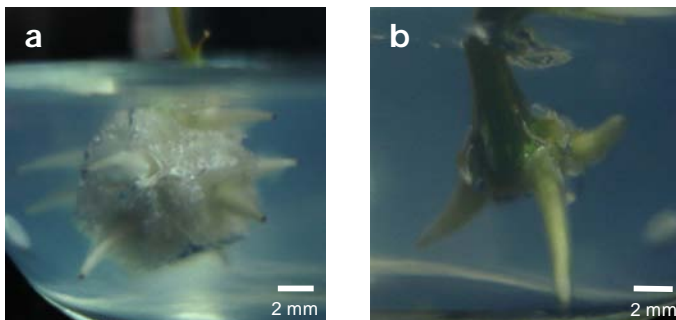
*D. brevis*, generada por el AIA en bajas concentraciones, es una actividad no reportada con anterioridad.

Además de sus propiedades antioxidantes, el carbón activado suele utilizarse en el cultivo *in vitro* debido a que, solo o en combinación con auxinas, inducen la formación de raíces en brotes micropropagados. También disminuye considerablemente la producción de callo en la base del explante (Thomas, 2008). El cultivo de meristemos apicales y yemas axilares de *D. pinnata* suplementado con ANA en combinación con carbón activado estimuló la formación de raíces en 40-92% de los brotes (Wang *et al.*, 1988), mientras que el cultivo de brotes de *D. imperialis* y *D. excelsa* en donde se adicionó carbón activado se generaron las raíces pero en el doble del tiempo en el que se presentó para aquellos tratamientos con AIA (González, 1999). No obstante, en el estudio aquí presentado, la adición de carbón activado no incrementó la formación de raíces, por el contrario, tanto en *D. tenuicaulis* como en *D. brevis*, disminuyó la longitud de éstas, una actividad que no ha sido reportada.

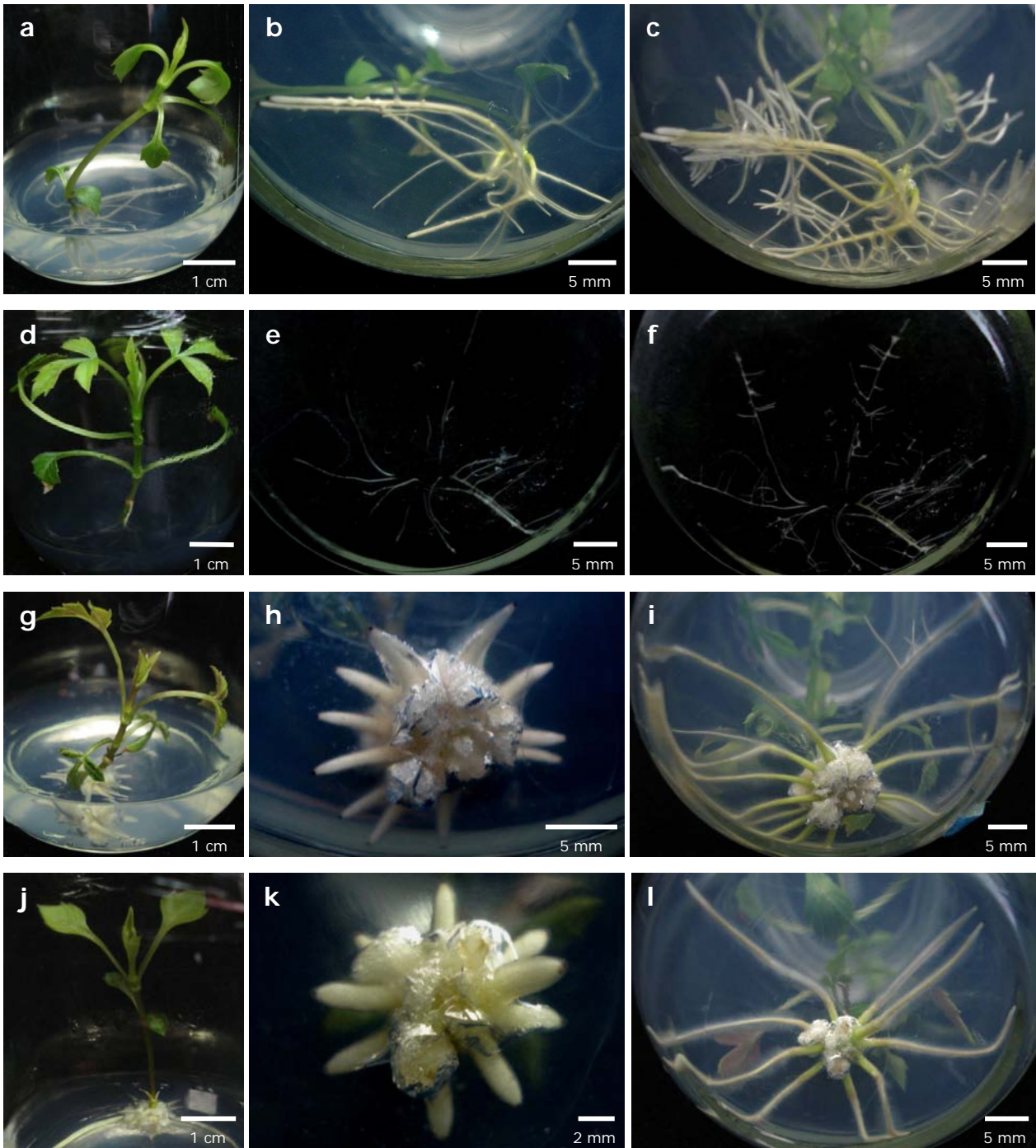
**Tabla 22.** Promedios de formación de raíces en brotes de *Dahlia* spp. después de 15 y 30 días de cultivo. Las letras indican la pertenencia al mismo grupo estadístico, letras diferentes indican diferencias significativas en el parámetro de crecimiento evaluado ( $p < 0.05$ ), **a** representando a los valores mayores y **c** a los menores.

a) Crecimiento de las raíces de <i>D. tenuicaulis</i>												
Tratamiento	Intervalo de Tiempo											
	15 días			30 días								
	no. de raíces	grosor	longitud	no. de raíces	grosor	longitud	no. de raíces	grosor	longitud			
1	1.4 ± 2.07	b,c	0.2 ± 0	a	2.49 ± 1.27	a	2.1 ± 2.03	b,c	0.2 ± 0.05	a	4.33 ± 3.4	a
2	0.4 ± 0.97	c	0.2 ± 0	a	2.05 ± 0.71	a	0.9 ± 0.99	c	0.2 ± 0	a	2.64 ± 1.15	b
3	11.1 ± 7.67	a	0.2 ± 0.05	a	0.63 ± 0.4	b	12.1 ± 6.72	a	0.2 ± 0.04	a	2.94 ± 1.78	a,b
4	5.8 ± 3.79	a,b	0.2 ± 0	a	0.43 ± 0.16	b	6.89 ± 3.52	b	0.2 ± 0	a	3 ± 1.3	a,b

b) Crecimiento de las raíces de <i>D. brevis</i>												
Tratamiento	Intervalo de Tiempo											
	15 días			30 días								
	no. de raíces	grosor	longitud	no. de raíces	grosor	longitud	no. de raíces	grosor	longitud			
1	0.56 ± 0.88	a	0.1 ± 0	b	2.64 ± 0.76	a	2.1 ± 2.03	b,c	0.2 ± 0.05	a	4.33 ± 3.4	a
2	0.5 ± 0.85	a	0.1 ± 0	b	1.4 ± 0.42	b	0.9 ± 0.99	c	0.2 ± 0	a	2.64 ± 1.15	b
3	1.9 ± 1.97	a	0.15 ± 0.04	b	0.63 ± 0.32	c	12.1 ± 6.72	a	0.2 ± 0.04	a	2.94 ± 1.78	a,b
4	2.5 ± 2.46	a	0.24 ± 0.5	a	0.61 ± 0.27	c	6.89 ± 3.52	b	0.2 ± 0	a	3 ± 1.3	a,b



**Figura 56.** Desarrollo de raíces como resultado de la adición de 2,4-D al medio de cultivo. **a)** Formación de raíces posterior al desarrollo de callo, y **b)** formación de raíces adventicias a partir de la base del tallo, ambos en *D. tenuicaulis*.



**Figura 57.** Brotes de *D. tenuicaulis* sometidos a diferentes tratamientos de enraizamiento después de 15 (a, b, d, e, g, h, j y k) y 30 días de inducción (c, f, i y l). **a, b y c)** T1; **d, e y f)** T2; **g, h e i)** T3; **j, k y l)** T4. En los tratamientos T1 y T2 las raíces tuvieron mayor longitud y fueron ramificadas, mientras que en T3 y T4, éstas fueron más cortas pero numerosas. Todas las raíces fueron de apariencia blanquecina y con abundantes pelos radicales.



**Figura 58.** Brotes de *D. brevis* sometidos a diferentes tratamientos de enraizamiento después de 15 (a, c, e y g) y 30 días de inducción (b, d, f y h).. **a)** T1, **b)** T2, **c)** T3, y **d)** T4. T1 generó un menor número de raíces, pero de mayor longitud, mientras que T4 estimuló la formación de más raíces aunque más cortas. T1 y T2 generaron raíces verdes poco ramificadas, mientras que T3 y T4, produjeron, en un inicio, raíces rojas sin ramificaciones, que posteriormente se tornaron verdes.

## **Aclimatización**

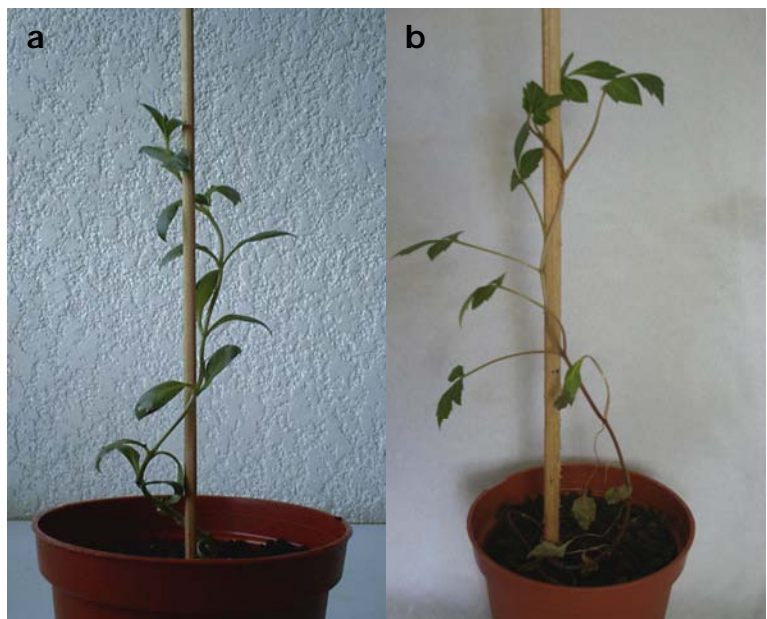
El proceso de aclimatización de las plantas enraizadas en la fase anterior se inició durante el mes de agosto de 2009, plantando 10 ejemplares de cada especie en tres sustratos diferentes: 1) tierra de hoja, 2) *Sphagnum* sp. y 3) mezcla de tierra de hoja con *Sphagnum* sp. 50:50.

El constante cambio en el clima ocurrido durante el segundo semestre de ese año promovió dos respuestas negativas, la primera fue la contaminación del sustrato y de las plantas por hongos durante los días nublados y lluviosos a pesar de la constante aplicación de Benomilo (1 g/l), fungicida de amplio espectro. Y en segundo lugar, la desecación completa de las plantas en un periodo no mayor a las 24 h durante los días calurosos, cuyo riego inmediato no permitió su recuperación. Estos resultados representan, por un lado, la evidente fragilidad de las plantas provenientes de los cultivos *in vitro*, cuyos estomas son inicialmente incapaces de evitar la transpiración de las plantas, contribuyendo así a su desecación; y por otro lado, la vulnerabilidad de los organismos ante los cambios energéticos en el ambiente. A pesar de dichos resultados, fue notable la sobrevivencia del 20% de las plantas, de ambas especies colocadas en la mezcla del sustrato (tierra de hoja y *Sphagnum* sp. 50:50) comparado con la muerte del 100% de los individuos plantados en los otros 2 sustratos.

Posteriormente, se aplicaron las mismas mezclas pero sin realizar el proceso de esterilización, con la finalidad de no eliminar a los microorganismos que se encuentran de forma natural en el sustrato y que mantienen una competencia con los organismos patógenos y por lo tanto, disminuyen su proliferación. Las plantas se cubrieron superficialmente con una bolsa de plástico, permitiendo la ventilación del sustrato, pero la acumulación de la humedad en la parte aérea de las plantas. Este método permitió la sobrevivencia del 80% de las plantas cultivadas en *Sphagnum* sp. y en tierra de hoja, y el 20% de las plantas cultivadas en la mezcla.

Mullin y Schlegel (1978), quienes cultivaron meristemos apicales de *Dahlia pinnata* Cav. lograron la formación de raíces en 18.6% de los brotes, de los cuales, únicamente el 12.7 % sobrevivieron al trasplante, a una mezcla de tierra de hoja, *Sphagnum* sp. y vermiculita.

Diversas especies de *Sphagnum* son utilizadas en la horticultura debido a su alta capacidad para retener agua, logrando acumular 16-26 veces su propio peso, además la acidificación que al suelo proporciona en conjunto con sus propiedades antisépticas (Bold *et al.*, 1989; Mellegård *et al.*, 2009), ha permitido su uso en la aclimatización de plantas micropropagadas, que son muy susceptibles a los microorganismos patógenos y a los cambios bruscos en la humedad del ambiente. Debido a lo anterior, los sustratos sin tratamiento de esterilización permitieron la exitosa aclimatización de los brotes (figura 59). Por un lado, la tierra de hoja por sí sola, brindó los nutrientes y microorganismos benéficos, mientras que el *Sphagnum* sp., permitió el mantenimiento de la humedad y el ambiente libre de patógenos, necesarios para la sobrevivencia de las plantas. En la mezcla, por el contrario, la humedad proporcionada por el *Sphagnum* sp. en combinación con la tierra de hoja, que redujo la acidez del suelo y proporcionó la materia orgánica, altamente nutritiva, promovió la proliferación de hongos que contaminaron, no sólo el sustrato, sino también las plantas, reduciendo la sobrevivencia del 80% de éstas.



**Figura 59.** Ejemplares aclimatizados de **a)** *D. brevis* y **b)** *D. tenuicaulis*, plantados en un sustrato formado por tierra de hoja y *Sphagnum* sp (50:50), después de 3 meses.



## Análisis Fitoquímico

Los extractos analizados, se obtuvieron de un macerado con HCl 2M de los siguientes materiales vegetales:

- a) Plantas cultivadas *in vitro* de *D. tenuicaulis*
- b) Callos de hojas de *D. tenuicaulis*, obtenidos a partir del tratamiento 4 (2,4-D 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l)
- c) Callos de tallos de *D. tenuicaulis*, obtenidos a partir del tratamiento 4 (2,4-D 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l)
- d) Hojas provenientes de plantas de *D. tenuicaulis* cultivadas en invernadero
- e) Inflorescencias provenientes de plantas de *D. tenuicaulis* cultivadas en invernadero
- f) Plantas cultivadas *in vitro* de *D. brevis*
- g) Callos de hojas de *D. brevis*, obtenidos a partir del tratamiento 4 (2,4-D 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l)

Debido a que las pruebas preliminares realizadas con los callos de tallos de *D. tenuicaulis*, arrojaron resultados interesantes, se incluyeron en esta sección. La ausencia de ejemplares de invernadero de *D. brevis* no permitió realizar su estudio, sin embargo, la presencia de un solo ejemplar de *D. tenuicaulis* en los invernaderos del Jardín Botánico Del Instituto de Biología UNAM, y con la valiosa donación de hojas e inflorescencias por parte del Dr. Robert Bye Boettler, nos permitió realizar en análisis, haciendo esta distinción de acuerdo a los estudios químicos previos en esta especie.

De esta manera, de acuerdo al método establecido previamente se procesaron 7 extractos, lograndose obtener dos fracciones orgánicas de cada uno de ellos, una fracción orgánica proveniente de la partición con acetato de etilo (Fracción Orgánica 1), y la segunda obtenida a partir de la partición con alcohol

amílico o *n*-pentanol (Fracción Orgánica 2). Así, la cromatografía en capa fina (CCF) se realizó con 14 fracciones orgánicas (tabla 23) y 7 referencias (tabla 24).

**Tabla 23.** Fracciones obtenidas a partir de los extractos de *D. brevis* y *D. tenuicaulis*.

Fracción	Clave
Fracción Orgánica 1 de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>D. tenuicaulis</i>	1
Fracción Orgánica 2 de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>D. tenuicaulis</i>	2
Fracción Orgánica 1 de callos obtenidos a partir de hojas de plantas de <i>D. tenuicaulis</i>	3
Fracción Orgánica 2 de callos obtenidos a partir de hojas de plantas de <i>D. tenuicaulis</i>	4
Fracción Orgánica 1 de callos obtenidos a partir de tallos de plantas de <i>D. tenuicaulis</i>	5
Fracción Orgánica 2 de callos obtenidos a partir de tallos de plantas de <i>D. tenuicaulis</i>	6
Fracción Orgánica 1 de hojas provenientes de plantas de invernadero de <i>D. tenuicaulis</i>	7
Fracción Orgánica 2 de hojas provenientes de plantas de invernadero de <i>D. tenuicaulis</i>	8
Fracción Orgánica 1 de inflorescencias provenientes de plantas de invernadero de <i>D. tenuicaulis</i>	9
Fracción Orgánica 2 de inflorescencias provenientes de plantas de invernadero de <i>D. tenuicaulis</i>	10
Fracción Orgánica 1 de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>D. brevis</i>	11
Fracción Orgánica 2 de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>D. brevis</i>	12
Fracción Orgánica 1 de callos obtenidos a partir de hojas de plantas de <i>D. brevis</i>	13
Fracción Orgánica 2 de callos obtenidos a partir de hojas de plantas de <i>D. brevis</i>	14

**Tabla 24.** Referencias complementarias para el análisis en CCF

Referencia	Clave
Quercetina	Q
Luteolina	L
Apigenina	A
Camperol	C
Naringenina	N
Propenona	P
Acacetina	Ac

El análisis de todas las fracciones de la Tabla 23 por CCF indicó la ausencia de los flavonoides utilizados como referencias. Sin embargo, pudo establecerse la producción de diversos compuestos fenólicos posiblemente de tipo flavonoide, tanto en las plantas de invernadero, como en los cultivos *in vitro* de plantas y callos. La ausencia de los flavonoides previamente reportados en las especies de

estudio puede deberse a diversos factores: (i) la baja concentración en el extracto; (ii) la falta de las enzimas necesarias para su elaboración en los cultivos *in vitro*. Así mismo, la ausencia de los compuestos en los ejemplares cultivados nos indica que la diferencia en las condiciones de crecimiento en relación a las de su hábitat natural también puede modificar el metabolismo secundario (Inderjit *et al.*, 1994). Por último, la ausencia de los flavonoides podría deberse a los problemas taxonómicos del género, pues a pesar de haberse realizado la primer revisión en 1969 por Sorensen, no fue sino hasta 2007, que Hansen publicó la clave para distinguir a las 34 especies de dalias actualmente reconocidas. Muchos de los estudios fitoquímicos de *Dahlia* spp., previos a la publicación de dicha clave, se realizaron mediante las extracciones con material proveniente de los ejemplares de herbario (Lam, 1973; Lam, 1998; Lam, 1971; Lam y Wrang, 1975), en donde un gran número de especies pudieron ser determinadas equívocamente, reportándose entonces, la presencia del metabolitos secundarios que probablemente pertenecían a otra especie.

El análisis de las fracciones obtenidas a partir del extracto de plantas cultivadas *in vitro* de *D. tenuicaulis*, indicó la presencia de un flavonoide de tipo aurona, ya que al visualizar las placas reveladas con  $AlCl_3$  en luz UVA, se apreció un cromóforo verdoso (figuras 60 y 61, carril 1). La sulfuretina ha sido la única aurona aislada en esta especie en conjunto con la chalcona buteína (Giannasi, 1975a y 1975b). La Fracción 2 no mostró ningún cambio ante el revelado, por lo cual se sugiere la ausencia de flavonoides en dicha fracción (figura 60 y 61, carril 2).

Las fracciones de los extractos obtenidos a partir de callos de hojas de la misma especie, mostraron la presencia de sólo un flavonoide en la Fracción 3, el cual, bajo luz UV se tornó color malva profundo (figura 60, carril 3). Este producto podría la 5,7,4'-trimetoxi flavanona o la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi flavanona,

compuestos aislados previamente en esta planta (Lam y Wrang, 1975). La Fracción 4 no posee flavonoides (figura 60 y 61, carril 4).

En el extracto de los callos de tallos de *D. tenuicaulis* no se detectó la formación de flavonoides, pues la aplicación de  $\text{AlCl}_3$  no reveló su presencia en ninguna de las dos fracciones, 5 y 6, aun mediante su observación bajo luz UV (figuras 60 y 61, carriles 5 y 6).

El análisis de la Fracción 7 de las hojas de plantas de invernadero de *D. tenuicaulis* demostró la presencia de únicamente un flavonoide, lo cual es contrastante con diversos resultados obtenidos en estudios anteriores, que describen la presencia de 5 flavonoides en sus hojas y 15 en toda la planta. Dicho flavonoide bajo luz UV se torna color café oscuro por lo que podría tratarse de un flavonol (figura 61, carril 7), probablemente el 5,7,4'-trimetoxi flavan-4-ol aislado previamente en esta especie (Kaufmann y Lam, 1967). Además puede observarse un cambio de absorción bajo luz UV de 2 cromoforos (figura 61, carril 7), sin embargo, en luz visible no se tornan amarillos (figura 60, carril 7), indicando que podría tratarse de compuestos capaces de crear complejos con el  $\text{AlCl}_3$ . La Fracción 8 no posee flavonoides (figura 61, carril 8).

La cromatoplaqueta de la Fracción 9 de los extractos de inflorescencias de *D. tenuicaulis* demostró la presencia de flavonoides. Cuando se observó la placa revelada con  $\text{AlCl}_3$  bajo luz UV (figura 61, carril 9), se aprecian 3 productos de naturaleza flavonoide (figura 60, carril 9). Uno de los compuestos de tipo flavonoide se torna color verde tenue bajo luz UV, correspondiendo a una aurona como la sulfuretina identificada en esta planta (Giannasi, 1975a y 1975b). El segundo compuesto adquiere un color café intenso, lo cual refiere a una flavona. En esta especie se han aislado la apigenina, luteolina, camperol y quercetina (Giannasi, 1975a y 1975b), sin embargo los experimentos de coelución indicaron

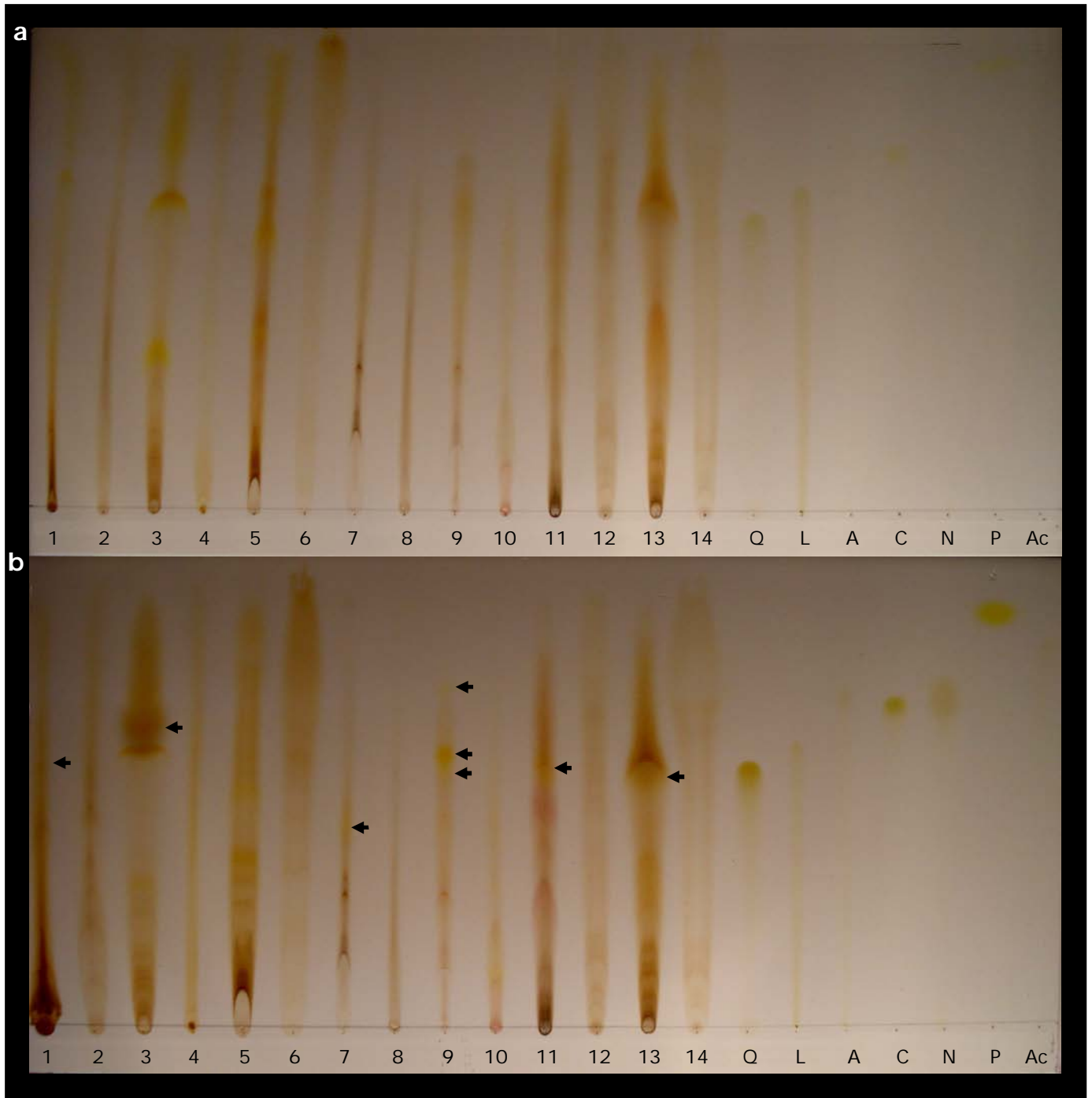
que ninguna de ellas corresponde al compuesto observado en el cromatograma. El tercer compuesto debido a su coloración amarillo brillante se puede suponer que sea una aurona (figura 61, carril 9), como la sulfuretina (Giannasi, 1975a y 1975b). La Fracción 10 no posee flavonoides (figuras 60 y 61, carril 10).

El análisis de las plantas cultivadas *in vitro* de *D. brevis*, mostró la clara presencia de 2 compuestos en la Fracción 11. Estos se aprecian con mayor notoriedad al revelar la placa con  $\text{AlCl}_3$ , (figura 61, carril 11), sin embargo no se observaron con la luz visible (figura 53, carril 11). La fluorescencia color café intenso que desarrollaron los productos bajo luz UV se relaciona con la presencia de flavonas (figura 61, carril 11). Éstas que no corresponden a ninguna de las previamente aisladas en esta segunda especie, es decir, apigenina, luteolina y quercetina ((Giannasi, 1975a y 1975b). La Fracción 12 no posee flavonoides (figuras 60 y 61, carril 12), a pesar de ello, se observó la presencia de un compuesto similar a los flavonoides capaz de crear complejos con  $\text{AlCl}_3$  (figura 61, carril 12).

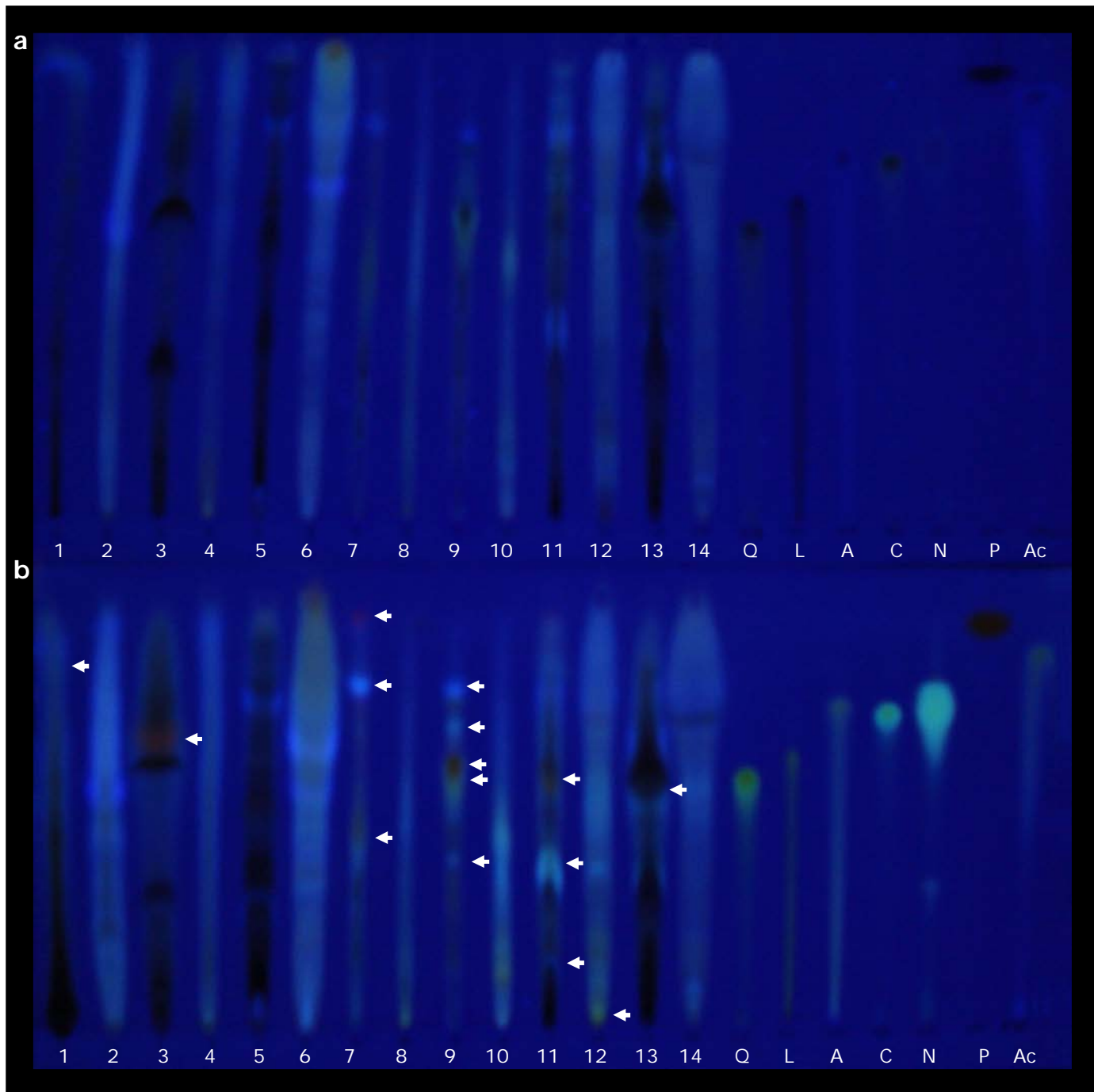
La Fracción 13 obtenida a partir del fraccionamiento del extracto de callos de *D. brevis* reveló la presencia de un compuesto color negro tenue bajo luz UV, sugiriendo la presencia de un flavonoide de tipo flavonol (figura 60, carril 13). Sin embargo, ningún flavonol ha sido aislado en esta planta. La Fracción 14 no posee flavonoides (figuras 60 y 61, carril 14).

En análisis fitoquímico indicó la presencia de una mayor cantidad de flavonoides y compuestos afines en las hojas e inflorescencias de *D. tenuicaulis* provenientes de plantas de invernadero. No obstante las plantas cultivadas *in vitro* de ambas especies, así como los callos provenientes de hojas generan compuestos tipo flavonoide. Estos hallazgos confirman que las plantas y callos poseen la maquinaria biosintética necesaria para la formación de flavonoides (Buchanan *et*

*al.*, 2001). Los callos provenientes de tallos de *D. tenuicaulis* no generan dichos metabolitos, haciendo evidente la importancia que adquiere el origen de las líneas celulares. Entonces los callos provenientes de hojas, órganos en donde se produce una mayor cantidad de flavonoides en las plantas silvestres, son capaces de producir flavonoides o precursores de éstos.



**Figura 60.** CCF de 7 extractos diferentes de *D. brevis* y *D. tenuicaulis*. **a)** Luz visible, **b)** Luz visible y revelado con  $AlCl_3$ . Carriles 1 -10 corresponden a *D. tenuicaulis*, 11-14 a *D. brevis*. Carriles 1, 2, 11 y 12 provienen de plantas cultivadas *in vitro*; 3, 4, 13 y 14 de callos de hojas; 5 y 6 de callos de tallos; 7 y 8 de hojas de plantas de invernadero; y 9 y 10 de inflorescencias de plantas de invernadero. Las flechas en **(b)** indican el revelado de flavonoides por la aplicación de  $AlCl_3$ . Mayores detalles en el texto. La descripción específica de la numeración de los carriles se encuentra en la tabla 24.



**Figura 61.** CCF de 7 extractos diferentes de *D. brevis* y *D. tenuicaulis* bajo luz UV 365 nm. **a)** Luz UV, **b)** Luz UV y revelado con AlCl<sub>3</sub>. Carriles 1 -10 corresponden a *D. tenuicaulis*, 11-14 a *D. brevis*. Carriles 1, 2, 11 y 12 provienen de plantas cultivadas *in vitro*; 3, 4, 13 y 14 de callos de hojas; 5 y 6 de callos de tallos; 7 y 8 de hojas de plantas de invernadero; y 9 y 10 de inflorescencias de plantas de invernadero. Las flechas en (b) indican el cambio en la absorción de luz debido a la aplicación de AlCl<sub>3</sub>. Mayores detalles en el texto. La descripción específica de la numeración de los carriles se encuentra en la tabla 24.



## 8. CONCLUSIONES

La respuesta ante el cultivo y la inducción hormonal fue diferente entre ambas especies, lo cual se asocia a los diferentes hábitos de crecimiento, pues *D. tenuicaulis* es una especie arbustiva (a.), mientras que *D. brevis* es herbácea (h.). La respuesta, a su vez, fue heterogénea entre los diferentes explantes utilizados.

Las regiones apicales y nudos cultivados *in vitro* de *D. brevis* y *D. tenuicaulis* fueron capaces de regenerar plantas completas.

En *D. tenuicaulis* (a.) las citocininas inhibieron la elongación de los ápices cultivados. En *D. brevis* (h.), la Kin en bajas concentraciones indujo un mayor crecimiento.

En *D. tenuicaulis* (a.), la Kin en alta concentración, y en *D. brevis* (h.), en baja concentración, promovió la formación de nudos.

La BA induce la formación de brotes en *D. tenuicaulis* (a.). Sin embargo en *D. brevis* (h.) la inducción hormonal durante un periodo de tiempo corto, inhibe su generación. La formación de brotes en *D. tenuicaulis* es mayor en los nudos basales, en *D. brevis* la brotación es homogénea entre los nudos basales y apicales.

Existe una correlación positiva entre la longitud de las plantas y el número de nudos formados en ambas especies, mientras que la correlación entre la longitud y el número de brotes generados es negativa.

En *D. tenuicaulis* (a.) la Kin generó brotes de mayor longitud en los nudos cultivados, aunque posteriormente el crecimiento se vuelve homogéneo. En contraste, en *D. brevis* (h.) se observó una periodicidad en las respuestas que no está relacionada con los fitorreguladores aplicados, la BA en bajas concentraciones generó brotes de mayor longitud.

En *D. tenuicaulis* (a.), la Kin en concentraciones altas, y en *D. brevis* (h.) en concentraciones bajas, promovió la formación de nudos en los brotes generados, finalmente el crecimiento es homogéneo.

En el 97.67% de los casos se activaron las yemas axilares en ambas especies, aunque siempre uno de los brotes originados tuvo mayor crecimiento.

La formación de raíces fue espontánea en la base de los ápices y nudos cultivados en medio basal, las citocininas inhibieron su organogénesis en ambas especies.

Los explantes provenientes de hojas fueron capaces de generar callo únicamente en presencia de auxinas y citocininas en *D. tenuicaulis* (a.), sin embargo en *D. brevis* (h.) la presencia de auxinas o citocininas o la combinación de estas produjo dicho efecto. Sólo en *D. brevis* la inducción con citocininas generó brotes a partir de los callos formados.

En *D. tenuicaulis* (a.) el mantenimiento la BA promovió la mayor formación de biomasa. En *D. brevis* (h.) el crecimiento fue mayor al mantener la aplicación de Kin y BA.

La organogénesis de raíces fue escasa y se presentó únicamente en los subcultivos en donde se eliminó la aplicación de citocininas.

En ambas especies, la inducción por auxinas, citocininas o la combinación de ambas indujo la formación de callo a partir de entrenudos. En *D. brevis* (h.), la organogénesis fue directa e indirecta, inducida por la aplicación de citocininas.

En *D. tenuicaulis* (a.) el mantenimiento de las citocininas indujo un mayor crecimiento en biomasa. En *D. brevis* (h.) no se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de los callos posterior al subcultivo.

La eliminación de las auxinas en los cultivos de callos de entrenudos de *D. tenuicaulis* (a.) promovió la formación de raíces. En *D. brevis* (h.) se formaron brotes en los entrenudos cultivados con citocininas.

Los callos formados en presencia de citocininas fueron densos, opacos y generan cloroplastos. Los callos formados en presencia de auxinas o ambas hormonas fueron friables, amarillos y translúcidos, en ambas especies y explantes.

El AIA indujo la formación de una mayor cantidad de raíces, el número de éstas aumentó conforme la concentración de la hormona fue mayor en ambas especies, pero inhibió su crecimiento en longitud y ramificación.

La aplicación de una baja concentración de AIA promovió la formación de raíces más gruesas en *D. brevis* (h.).

Las dos especies respondieron de forma similar ante la aclimatización. Los sustratos no estériles permitieron la sobrevivencia del 80% de las plantas cultivadas en *Sphagnum* sp. o tierra de hoja.

Las hojas e inflorescencias de *D. tenuicaulis* (a.) provenientes de plantas de invernadero formaron una mayor cantidad compuestos tipo flavonoide en relación a las plantas cultivadas *in vitro* de ambas especies.

Los callos provenientes de hojas y plantas *in vitro* de ambas especies generaron compuestos tipo flavonoide, no así los callos formados a partir de entrenudos.

Los flavonoides apigenina, camperol, luteolina y quercetina, previamente reportados en las dalias estudiadas, no se detectaron en los cultivos *in vitro* ni en plantas de invernadero.

## 9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo representa la obtención de un método exitoso de conservación *ex situ* y propagación de *D. brevis* y *D. tenuicaulis*, y permite formular las siguiente recomendaciones y perspectivas.

1) La falta de conocimiento acerca de flora mexicana es un factor detonante de la rápida desaparición de especies prioritarias. A pesar de que *D. tenuicaulis* se encuentra sujeta a protección especial de acuerdo a la NOM-059-ECOL-2001, *D. brevis* carece de alguna categoría. El último registro de su colecta se realizó en 1995, año desde el cual no se han encontrado más ejemplares silvestres, por lo cual se sugiere su inclusión en esta Norma Oficial en la categoría de especie extinta en la naturaleza.

2) La búsqueda de un método alternativo que permita el aumento en la sobrevivencia de las plantas durante el proceso de aclimatización, permitiría la optimización de la micropropagación, en un inicio, que nos permitiera la obtención de plantas para su conservación en Jardines Botánicos y Colecciones Botánicas, que además representen una fuente permanente de ejemplares para su posterior estudio. Así mismo, haría posible su explotación comercial debido al potencial que *D. tenuicaulis* representa debido a su excepcional hábito de crecimiento en relación al de las dalias populares, así como debido a la belleza de sus flores, con el objetivo principal de difundir su importancia cultural y biológica.

3) La realización de cortes histológicos sería de gran utilidad para esclarecer la posible formación de embriones somáticos en los cultivos. De confirmarse este evento, el estudio posterior de la respuesta de los embriones ante diferentes condiciones permitiría la conservación *in vitro* de estas especies, y finalmente y a largo plazo, la formación de un banco de germoplasma que complemente la

Colección Nacional de Dalias, puesto que dichos cultivos expresan un alto potencial para la regeneración de plantas completas.

4) Analizar la presencia potencial de flavonoides en los extractos de cultivos provenientes de tratamientos alternos, permitiría completar el estudio de estos metabolitos en el material vegetal obtenido *in vitro*. Se propone realizar un análisis mediante el uso de técnicas de separación de mayor resolución como la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC), así como detectar la presencia de tiofenos y poliacetilenos en los cultivos *in vitro* mediante la aplicación de los métodos fitoquímicos apropiados. Lo anterior con la finalidad de establecer la actividad biológica de los compuestos aislados, probables responsables de las propiedades medicinales reportadas para el género *Dahlia*. La aplicación de nuevos reguladores de crecimiento, o bien, la optimización del método aquí establecido para la regeneración de callos permitiría mejorar el rendimiento en la producción de metabolitos secundarios.

De esta forma se sugiere el Cultivo de Tejidos Vegetales en combinación con técnicas de análisis fitoquímico, como bases importantes para la conservación y uso sostenible de ambas especies, siendo complementados por estudios prioritarios, en *D. tenuicaulis*, sobre su dinámica poblacional, genética, reproducción y papel ecológico que juega dentro de su hábitat natural.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1

Insecticida natural para plagas que atacan tallos, follaje, brotes y botones florales (Bunge y Tenango, 2005)

#### Composición:

- 10 dientes de ajo
- 1 cebolla mediana
- 10 chiles verdes
- ½ jabón neutro mediano

#### Preparación y aplicación:

Todos los ingredientes se trituran y se dejan reposar durante 5 horas diluidos en 4 litros de agua, posteriormente se cuela y el líquido se asperja sobre el follaje y las zonas afectadas, cada tercer día durante 2 semanas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA:

- ❖ Afifi, M.; A. El-Kereamy; V. Legrand; C. Chervin; M. C. Monje; F. Nepveu; and J. P. Roustan. 2003. Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. *Journal of Plant Physiology* **160**: 971–975.
- ❖ Antognoni, F.; S. Zheng; C. Pagnucco; R. Baraldi; F. Poli; and S. Biondi. 2007. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia* **78**: 345–352.
- ❖ Art Vogel. 2009. <http://picasaweb.google.com/art.allaboutnature.vogel> (Consulta 25 de enero de 2010).
- ❖ Ayabe, S. I.; M. Kobayashi; M. Hikichi; K. Matsumoto; and T. Furuya. 1980. Flavonoids from the cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*. *Phytochemistry* **19**(10): 2179-2183.
- ❖ Balleza C., J. J y J. L. Villaseñor. 2002. La familia Asteraceae en el estado de Zacatecas (México). *Acta Botánica Mexicana* **59**: 5-69.
- ❖ Bao-Do, C.; F. Cormier; and Y. Nicolas. 1995. Isolation and characterization of a UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase from grape cell suspension cultures (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science* **112**(1): 43-51.
- ❖ Bendixen, O; J. Lam; and F. Kaufmann. 1969. Chemical constituents of the genus *Dahlia*. IV. Polyacetylenes of *Dahlia pinnata*. *Phytochemistry* **8**(6): 1021-1024.
- ❖ Berlin, J. und W. Barz. 1971. Stoffwechsel von Isoflavonen und Cümostanen in Zell- und Callussuspensionskulturen von *Phaseolus aureus* Roxb. *Planta* **98**: 300-314.
- ❖ Bold, H.C.; C.J. Alexopoulos; y T. Delevoryas. 1989. *Morfología de las plantas y los hongos*. Ediciones Omega, Barcelona. 910 p.



- ❖ Bolívar-Zapata, F. 2003. *Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México*. CONACYT y Academia Mexicana de Ciencias. México. 154 p.
- ❖ Booth, S.; R. Bressani; and T. Johns. 1992. Nutrient content of selected indigenous leafy vegetables consumed by the Kekchi people of Alta Verapaz, Guatemala. *Journal of Food Composition and Analysis* **5**(1): 25-34.
- ❖ Buchanan, B. B.; W. Gruissem; and R. L. Jones. 2001. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, 1367 p.
- ❖ Bunge, V. y J. L. Tenango. 2005. *Folleto de divulgación: Insecticidas caseros*. UNIVERSUM, Museo de las Ciencias, UNAM. 5 p.
- ❖ Bye, R. 1998. *La Intervención del Hombre en la Diversificación de las Plantas en México*. En: Ramamoorthy, Bye, Lote y Fa (Eds.) *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 689-714 p.
- ❖ Callebaut, A.; G. Hendrickx; A. M. Voets; and J. C. Motte. 1990. Anthocyanins in cell cultures of *Ajuga reptans*. *Phytochemistry* **29**: 2153–2158.
- ❖ Canter, P. H.; H. Thomas; and E. Ernst. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology* **23**(4): 180-185.
- ❖ Cashyap, M.M.; J.S.H. Kueh; I.A. Mackenzie; and G. Pattenden. 1978. *In vitro* synthesis of pyrethrins from tissue cultures of *Tanacetum cinerariifolium*. *Phytochemistry* **17**(3): 544-545.
- ❖ Chapela, F. y B. Ortiz. 2006. *El uso sostenible de la diversidad biológica: hacia un nuevo paradigma de la conservación*. Estudios Rurales y Asesoría, A.C. México. 12 p.
- ❖ Christensen, L. P.; J. Lam; and T. Thomassen. 1990. Thiophene derivatives and polyacetylenes from *Dahlia tubulata*. *Phytochemistry* **29**(10): 3153-3154.
- ❖ Cline, L. G. 1976. Some common misconceptions concerning hormone experiments with excised plant tissue. *Plant Science Letters* **6**: 181-184.

- ❖ CONAFOR. 2007. México Forestal, Revista Electrónica de la Comisión Nacional Forestal **67**. <http://www.mexicoforestal.gob.mx>
- ❖ Cuanalo de la Cerda, H.; E. Ojeda-Trejo; A. Santos-Ocampo; y C.A. Ortiz-Solorio. 1989. *Provincias Regiones y Subregiones Terrestres de México*. Chapingo, Mexico: Colegio de Postgraduados. 624 p.
- ❖ Davies, P. J. 2007. Plant Hormones, biosynthesis, signal transduction, Action!. 3ra Ed. Springer, Netherlands. 750 p.
- ❖ Delle Monache, G.; M. C. De Rosa; R. Scurria; A. Vitali; A. Cuteri; B. Monacelli; G. Pascua; and B. Botta. 1995. Comparison between Metabolite Productions in Cell Culture and in whole Plant of *Maclura Pomifera*. *Phytochemistry* **39**(3):575-580.
- ❖ Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. México. 281 p.
- ❖ Farag, M. A.; D. V. Huhman; Z. Lei; and L. W. Sumner. 2007. Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC–UV–ESI–MS and GC–MS. *Phytochemistry* **68**(3): 342-354.
- ❖ Gavilertvatana, P. E.; P. E. Read; H. F. Wilkins; and R. Heins. 1982. Ethylene levels in flask atmospheres on *Dahlia pinnata* Cav. Leaf segments and callus cultured *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**: 3-6.
- ❖ George, E. F.; M. A. Hall; y and G. J. de Klerk. Eds. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3ra Ed. Springer. Dordrecht. 501 p.
- ❖ Giannasi, D. E. 1975a. The flavonoid systematics of the genus *Dahlia*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **26**(2): 1-125.
- ❖ Giannasi, D. E. 1975b. Flavonoid chemistry and evolution in *Dahlia* (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **102**(6): 404-412.
- ❖ González, A. S. 1999. *Regeneración in vitro de Dahlia excelsa Benth y Dahlia imperialis* Roehl. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 97 p.

- ❖ Hahlbrock, K. 1972. Isolation of apigenin from illuminated cell suspension cultures of soybean, *Glycine max.* *Phytochemistry* **11**(1): 165-166.
- ❖ Hahlbrock, K.; K. H. Knobloch; F. Kreuzaler; J. R. Potts; and E. Wellmann. 1976. Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* **61**(1): 199-206.
- ❖ Hansen, H. V. 2007. Simplified keys to four sections with 34 species in the genus *Dahlia* (Asteraceae – Coreopsideae). *Nordic Journal of Botany* **24**: 549-553.
- ❖ Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*. 2<sup>da</sup> Ed. Chapman and Hall, Nueva York. 288 p.
- ❖ Harborne, J. B. 1989. Volume 1, Plant Phenolics. En: Dey, P. M. y J. B. Harborne. *Methods in Plant Biochemistry*. Academia Press, London. 552 p.
- ❖ Harborne, J. B.; T. J. Mabry; and H. Mabry. 1975. *The flavonoids*. Chapman and Hall. London. 1204 p
- ❖ Hartmann, M. A.; P. Benveniste; and F. Durst. 1972. Biosynthesis of sterols in jerusalem artichoke tuber tissue. *Phytochemistry* **11**(10): 3003-3005.
- ❖ Hernández, F. 1946. *Historia de las plantas de la Nueva España*. 3 Vols. México, D.F. (Citado en Whitley, 1985)
- ❖ Hernández, P. F. 1993. Cultivo de tejidos de dalia (*Dahlia* spp.). Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México, 42p.
- ❖ Hitmi, A.; A. Coudret; and C. Barthomeuf. 2000. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**(5): 317-337.
- ❖ Hutchison, C. E. and J. J. Kieber. 2002. Cytokinin Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**: S47-S59.

- ❖ Inderjit, Dakshini, K.M.M., and Einhellig, F.A. (Eds.). 1994. Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. *American Chemical Society Symposium Series* **582**. Wiley VCH, Washington. 389 p.
- ❖ Ishimaru, K.; M. Osabe; L. Yan; T. Fujioka; K. Mihashi; and N. Tanaka. 2003. Polyacetylene glycosides from *Pratia nummularia* cultures. *Phytochemistry* **62**(4): 643-646.
- ❖ Jeong, S. T.; N. Goto-Yamamoto; S. Kobayashi; and M. Esaka. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* **167**(2): 247-252.
- ❖ Kakegawa, K.; Y. Kaneko; E. Hattori; K. Koike; and K. Takeda. 1987. Cell cultures of *Centaurea cyanus* produce malonated anthocyanin in UV light. *Phytochemistry* **26**(8): 2261-2263.
- ❖ Kakimoto, T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 605-627.
- ❖ Kanehira, T.; S. Takekoshi; H. Nagata; K. Matsuzaki; Y. Kambayashi; R. Y. Osamura; and T. Hommafrom. 2003. Novel and potent biological antioxidant, Kinobeon A, cell culture of safflower. *Life Sciences* **74**: 87-97.
- ❖ Kaufmann, F. and J. Lam. 1965. Chemical constituents of the genus *Dahlia*. Two Polyacetylenic Compounds from *Dahlia scapigera* Link et Otto. *Acta Chemica Scandinavica* **19**(5): 1267-1268.
- ❖ Kaufmann, F.; and J. Lam. 1967. Chemical constituents of the genus *Dahlia* II. The isolation of two aromatic compounds: naringenin trimethyl ether and fraxidin. *Acta Chemica Scandinavica* **21**(1): 311-313.
- ❖ Kende, H. and J. A. D. Zeevaart. 1997. The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell* **9**(1): 197-121.
- ❖ Kepinski, S. and O. Leyser. 2002. Ubiquitination and Auxin Signaling: A Degrading Story. *The Plant Cell* **14**: S81-S95.

- ❖ Ketel, D. H. 1978. Distribution and Accumulation of Thiophenes in Plants and Calli of Different *Tagetes* Species. *Journal of Experimental Botany* **38**(2): 322-330.
- ❖ Klingauf, P.; T. Beuerle; A. Mellenthin; S. A.M. El-Moghazy ; Z. Boubakir; and L. Beerhues. 2005. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* **66**: 139–145.
- ❖ Kokubo, T.; Y. Ambe-ono; M. Nakamura; H. Ishida; T. Yamakawa; and T. Kodama. 2001. Promotive Effect of Auxins on UDP-Glucose: Flavonol Glucosyltransferase Activity in *Vitis* sp. Cell Cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**(6): 564-569.
- ❖ Konczak-Islam, I.; M. Yoshinaga; M. Nakatani; N. Terahara; and O. Yamakawa. 2000. Establishment and characteristics of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root. *Plant Cell Reports* **19**: 472–477.
- ❖ Kreuzaler, F. and K. Hahlbrock. 1973. Flavonoid glycosides from illuminated cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Phytochemistry* **12**(5): 1149-1152.
- ❖ Lam, J. 1971. Chemical constituents of genus *Dahlia* V. Polyacetylenes in *Dahlia imperialis* and *Dahlia tenuicaulis*. *Phytochemistry* **10**(9): 2227-2228.
- ❖ Lam, J. 1973. Polyacetylenes of *Dahlia*. *Biochemical Systematics* **1**(2): 83-86.
- ❖ Lam, J. 1998. Acetylenes in the genus *Dahlia*, Asteraceae. *Phytochemistry* **49**(2): 513-519.
- ❖ Lam, J. 1998. Acetylenes in the genus *Dahlia*, Asteraceae. *Phytochemistry* **49**(2): 513-519.
- ❖ Lam, J. and F. Kaufmann. 1971. Chemical constituents of the genus *Dahlia*. VI. Polyacetylenic C14-epoxide and C14-tetrahydropyranyl compounds from *Dahlia scapigera*. *Phytochemistry* **10**(8): 1877-1880.
- ❖ Lam, J. and P. Wrang. 1975. Chemical constituents of the genus *Dahlia* 6. Flavonoids and polyacetylenes in *Dahlia tenuicaulis*. *Phytochemistry* **14**(7): 1621-1623.

- ❖ Lam, J.; F. Kaufmann; and O. Bendixen. 1968. Chemotaxonomic evaluation of some *Dahlia coccinea* strains. *Phytochemistry* **7**(2): 269-275.
- ❖ Lam, J.; L. P. Christensen; and T. Thomassen. 1991. Polyacetylenes from *Dahlia* species. *Phytochemistry* **30**(2): 515-518.
- ❖ Lee, S. Y.; S. I. Cho; M. H. Park; Y. K. Kim; J. E. Choi; and S. U. Park. 2007. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **37**: 239-246.
- ❖ Leyser, O. 2002. Molecular Genetics of Auxin Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 377-398.
- ❖ Li, F. X.; Z. P. Jin; D. X. Zhao; L. Q. Cheng; C. X. Fu; and F. Ma. 2006. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry* **67**(6): 553-560.
- ❖ Li, W.; Y. Asada; and T. Yoshikawa. 2000. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry* **55**(5): 447-456.
- ❖ Lin, T. J.; and P. Heinstein. 1974. *In vitro* biosynthesis of isopentenylacetophenones in *Eupatorium rugosum*. *Phytochemistry* **13**(9): 1817-1823.
- ❖ Madhavi, D. L.; J. Bomser; M. A. L. Smith; and K. Singletary. 1998. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. *Plant Science* **131**(1): 95-103.
- ❖ Matkowski, A. 2004. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. *Journal of Plant Physiology* **161**(3):343-346.
- ❖ McLachlan, D.; T. Arnason; and J. Lam. 1986. Structure-Function Relationships in the Phototoxicity of Acetylenes from the Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **14**(1): 17-23.
- ❖ Mejía-Muñoz, J.M.; A. Espinosa; L. M. Mera; A. Laguna-Cerda; R. Bye; y G. Treviño. 2007. "Propagación de dalias en México". Publicación de Difusión 2. SNICS-SAGARPA, Chapingo. 34 p.

- ❖ Mellegård, H.; T. Stalheim; V. Hormazabal; P. E. Granum; and S. P. Hardy. 2009. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **49**(1): 85-90.
- ❖ Mera O. L. M. y R. Bye. 2006. La Dahlia una belleza originaria de México. *Revista Digital Universitaria* **7**: 1-11.
- ❖ Meyer, H. J. and J. van Staden. 1995. The *in vitro* production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **40**: 55–58.
- ❖ Misra, N; P. Misra; S. K. Datta; and S. Mehrotra. 2005. *In vitro* biosynthesis of antioxidants from *Hemidesmus indicus* R. Br. cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **41**: 2285–90.
- ❖ Mitsuharu, O.; D. Masako; and K. Mitsuko (Ichimaru Pharcos Inc., Japan). Jpn. Kokai Tokyo Koho. 2001. Cosmetics, bath preparations, and detergents containing plant extracts. 23 p. CODEN: JKXXAF JP 2001122730 A2 20010508 Patent written in Japanese. Application: JP 99-303537 19991026. CAN 134:331353 AN 2001:324413 CAPLUS.
- ❖ Miura, H.; Y. Kitamura; T. Ikenaga; K. Mizobe; T. Shimizu; M. Nakamura; Y. Kato; T. Yamada; T. Maitani; and Y. Goda. 1998. Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry* **48**: 279–283.
- ❖ Mok, M. C.; W. H. Gabelman; and F. Skoog. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **101**: 442–449.
- ❖ Morel, G. et C. Martin. 1952. Guèrison de dalias atteints d´ une maladie á virus. *Comptes Rendus de l Academie des Scencies* **235**: 1324-1325.
- ❖ Muckensturm, B.; B. P. Riss; P. C. Robert; M. T. Simonis; and J. C. Kienlen. 1986. Substances antiappétantes pour insectes phytophages. *Biochemical Systematics and Ecology* **14**(1): 123-127.
- ❖ Mullin, R. H. and D. E. Schlegel. 1978. Meristem-tip culture of dahlia infected with dahlia mosaic virus. *Plant Disease Reporter* **62**: 565-567.

- ❖ Neuschild, K.; L. P. Christensen; and J. Lam. 1992. An acetylenic hydrocarbon from *Dahlia merckii*. *Phytochemistry* **31**(12): 4353-4354.
- ❖ Niness, K. R. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *The Journal of Nutrition* **129**: 1402S-1406S.
- ❖ Nishikawa, K.; H. Furukawa; T. Fujioka; H. Fujii; K. Mihashi ; K, Shimomura; and K. Ishimaru. 1999. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Phytochemistry* **52**: 885–890.
- ❖ NOM-059-ECOL-2001
- ❖ Omoto, T.; I. Asai; K. Ishimaru; and K. Shimomura. 1998. Geranyl isovalerate accumulation in adventitious root culture of *Anthemis nobilis*. *Phytochemistry* **48**(6): 971-97.
- ❖ Ono, K.; M. Nakao; M. Toyota; Y. Terashi; M. Yamada; T. Kohno; and Y. Asakawa. 1998. Catechin production in cultured *Polygonum hydropiper* cells. *Phytochemistry* **49**(7): 1935-1939.
- ❖ Ortiz-Bermudez, E., Villaseñor, J. L. y O. Téllez. 1998. La familia Asteraceae en el Estado de Nayarit (México). *Acta Botánica Mexicana* **44**: 25-57.
- ❖ Osborn, R. W.; G. W. De Samblanx; K. Thevissen; I. Goderis; S. Torrekens; F. Van Leuven; S. Attenborough; S. B. Rees; and W. F. Broekaert. 1995. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters* **368**(2): 257-262.
- ❖ Ozeki, Y. 1996. Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells. *Journal of Plant Research* **109**(3): 343-351.
- ❖ Paján, M.; C. Villalón R.; J. C. Escalona; A. Bordies; y R. Valdés. 2002. Determinación de los posibles tipos de flavonoides presentes en el limo medicinal, materia prima. *Revista Cubana de Química* **XIV**(3): 16-23.
- ❖ Pasqua, G.; P. Avato; B. Monacelli; A. R. Santamaria; and M. P. Argentieri. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science* **165**(5): 977-982.
- ❖ Pasternak, T.; G. Potters; R. Caubergs; and M. A. Jansen. 2005. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control



- plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* **56**(418): 1991-2001.
- ❖ Pennell, R. I. and C. Lamb. 1997. Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell* **9**(7): 1157–1168.
  - ❖ Ramachandra, S. and G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **20**: 101–153.
  - ❖ Razdan, M. K. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2da Ed. Science Publishers, Inc. New Hampshire. 375 p.
  - ❖ Read, P. E. and C. D. Fellman. 1985. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae* **166**: 15-20.
  - ❖ Read, P. E. and P. Gavilertvatana. 1976. Advances in tissue culture: ray flower and protoplast culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society* **26**: 275-286.
  - ❖ Reyes, J.; C. Brachet; J. Pérez; y A. Gutiérrez. 2004. *Cactáceas y otras plantas nativas de la Cañada de Cuicatlán, Oaxaca*. CFE., SMC., IBUNAM., CNANP., CUICATLAN A. C. 47p. (Citado en Mera y Bye, 2006)
  - ❖ Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia. 970 p.
  - ❖ Saad, I.; E. Díaz; I. Chávez; R. Reyes-Chilpa; A. Rubluo; and M. Jiménez-Estrada. 2000. Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry* **55**(1): 51-57.
  - ❖ SEMARNAT. 2008. *Informe de la situación del medio ambiente en México, compendio de estadísticas ambientales*.
  - ❖ Sharp, W. R.; P. O. Larsen; E. F. Paddock; and V. Raghavan. 1979. *Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications*. Ohio State University Press. Ohio. p. 117.
  - ❖ Smith, R. 2000. *Plant Tissue Culture, techniques and experiments*. 2da Ed. Academic Press, California. 231 p.

- ❖ Sorensen, P. D. 1969. Revision of the genus *Dahlia* (Compositae-Heliantheae, Coreopsidinae). *Rhodora* **71**: 309-416.
- ❖ Sorensen, P. D. 1970. The *Dahlia*: An Early History. *Arnoldia* **30**: 121–138.
- ❖ Staba, E. J. 1980. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 285 p.
- ❖ Strange Wonderful Things. 2010.  
[http://www.strangewonderfulthings.com/Dahlia\\_tenuicaulis\\_Tree\\_Dahlia\\_9209.jpg](http://www.strangewonderfulthings.com/Dahlia_tenuicaulis_Tree_Dahlia_9209.jpg) (Consulta 25 de enero de 2010).
- ❖ Szöke, E.; M. E. Máday; S. A. Kiss; L. Sonnewend; and E. Lemberkovics. 2004. Effect of Magnesium on Essential Oil Formation of Genetically Transformed and Non-Transformed Chamomile Cultures. *Journal of the American College of Nutrition* **23**(6):763S–767S.
- ❖ Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. Ed. Sinauer. Massachusetts, 690 p.
- ❖ Tavares, L. S.; M. O. Santos; L. F. Viccini; J. S. Moreira; R. N. G. Miller; and O. L. Franco. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* **29**(10): 1842-1851.
- ❖ Thevissen, K.; B. P. Cammue; K. Lemaire; J. Winderickx; R. C. Dickson; R. L. Lester; K. K. Ferket; F. Van Even; A. H. Parret; and W. F. Broekaert. 2000a. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)* **97**(17): 9531-9536.
- ❖ Thevissen, K.; R. W. Osborn; D. P. Acland; and W. F. Broekaert. 2000b. Specific binding sites for an antifungal plant defensin-from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 54–61.
- ❖ Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* **26**: 618–631.
- ❖ Trajtemberg, S. P.; N. M. Apóstolo; and G. Fernández. 2006. Calluses of *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* cardoon (Asteraceae): determination of

- cynarine and chlorogenic acid by automated high-performance capillary electrophoresis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **42**: 534–537.
- ❖ Treviño, G.; L. M. Mera; R. Bye; J. M. Mejía-Muñoz; y A. Laguna. 2007. Historia de la Dalia (Acocoxóchitl) la flor nacional de México. Publicación de Difusión 1. SNICS-SAGARPA. 27 p.
  - ❖ Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2008.  
<http://www.tropicos.org/Name/50153869>. (Consulta 10 de junio de 2008).
  - ❖ Turrini, A; C. Sbrana; L. Pitto; M. Ruffini-Castiglione; L. Giorgetti; R. Briganti; T. Bracci; M. Evangelista; M. P. Nuti; and M. Giovannetti. 2004- The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **163**: 393–403.
  - ❖ Vaishnav, K.; S. Goyal; and K. G. Ramawat. 2006. Isoflavonoids production in callus culture of *Pueraria tuberosa*, the Indian kudzu. *Indian Journal of Experimental Biology* **44**(12):1012-1017.
  - ❖ Wagner, H. 1977. *Pharmaceutical and economic uses of the Compositae*. En: Heywood, V. H.; J. B. Harborne; y B. L. Turner. Eds. *The Biology and chemistry of the Compositae*, Vol I. Academic Press. London. 619 p.
  - ❖ Wang W. C.; M. Tronchet; N. Larroque ; N. Dorion ; and J. Albouy. 1988. Production of virus free dahlia by meristem- culture and virus detection through cDNA probes and ELISA. *Acta Horticulturae* **234**: 421-428.
  - ❖ Washida, D.; K. Shimomura; and S. Kitanaka S. 2003. Polyacetylenes in hairy roots of a panax hybrid. *Planta Medica* **69**(12):1163-1165.
  - ❖ Wat, C. K.; S. K. Prasad; E. A. Graham; S. Partington; T. Arnason; and G. H. N. Towers. 1981. Photosensitization of invertebrates by natural polyacetylenes. *Biochemical Systematics and Ecology* **9**:59–62.
  - ❖ Wei, S. L.; P. M. Li; Z. P. He; and B. W. Han. 1990. Rapid propagation of monomerous stem by tissue culture *Dahlia pinnata* Cav. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis* **16**(4): 381-385. (citado en González, 1999)

- ❖ Whitley, G. R. 1985. The medicinal and nutritional properties of *Dahlia* spp. *Journal of Ethnopharmacology* **14**(1):75-82.
- ❖ Woodward, A. W. and B. Bartel. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**: 707–735.
- ❖ Yamamoto, H.; P. Zhao; and K. Inoue. 2002. Origin of two isoprenoid units in a lavandulyl moiety of sophoraflavanone G from *Sophora flavescens* cultured cells. *Phytochemistry* **60**(3): 263-267.
- ❖ Yamanaka, M.; K. Ishibashi; K. Shimomura; and K. Ishimaru. 1996. Polyacetylene glucosides in hairy root cultures of *Lobelia cardinalis*. *Phytochemistry* **41**(1): 183-185.
- ❖ Zaragoza, H. A. Y. 2004. Cultivo de cotiledones *in vitro* de dalia (*Dahlia imperialis* Roezl ex Ortgies) en Chapingo, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 69 p.
- ❖ Zhao, P.; C. Amada; K. Inoueb; and H. Yamamotoa. 2003. Efficient production and capture of 8-prenylnaringenin and leachianone G—biosynthetic intermediates of sophoraflavanone G—by the addition of cork tissue to cell suspension cultures of *Sophora flavescens*. *Phytochemistry* **62**: 1093–1099.
- ❖ Zhu, Y. J.; R. Agbayani; and P. H. Moore. 2007. Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin *DmAMP1* improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. *Planta* **226**: 87-97.