



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGENERACIÓN *in vitro* DE *Cosmos pringlei* ROB. & FERN.
(ASTERACEAE) Y OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

WENDY ROCIO JUÁREZ PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
TUTORA INVITADA: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx. MAYO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de enero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **JUÁREZ PÉREZ WENDY ROCÍO** con número de cuenta 98091087 con la tesis titulada "**Regeneración in vitro de *Cosmos pringlei* Rob. & Fern. (Asteraceae) y obtención de compuestos bioactivos**", realizada bajo la dirección del **DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER**:

Presidente: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal: DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
Secretario: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
Suplente: DRA. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
Suplente: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 4 de abril de 2017.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la aceptación, oportunidad y apoyo para llevar a cabo mis estudios Maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (becario no. 270117) para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco profundamente a mi Comité Tutorial por todo el apoyo, el tiempo, la paciencia y el esfuerzo invertidos; así como el haberme compartido sus enormes conocimientos y su guía para poder llevar a cabo esta investigación:

Dr. Robert Arthur Bye Boettler

Dra. Rachel Mata Essayag

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Dra. María del Pilar Ortega Larrocea

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por dejarme seguir formando, con orgullo, parte de esta gran Institución, por brindarme la oportunidad de superarme académica, profesional y personalmente.

Al Jardín Botánico del Instituto Biología-UNAM, por sus bellos jardines, por ser una inspiración y un espacio de liberación para mí.

Quiero agradecer a los integrantes del jurado por sus valiosos y acertados comentarios que enriquecieron esta investigación. Por ver esos detalles que fueron invisibles para mí, pero que, con su apoyo, su tiempo, sus conocimientos y su amable disposición me fue posible verlos:

Dr. Manuel Jiménez Estrada

Dra. Josefina Herrera Santoyo

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Dra. Rachel Mata Essayag

Al Dr. Robert Bye, por creer en mí y aceptar ser mi tutor. Gracias por sus consejos, por su tiempo y por compartir sus conocimientos acerca del pueblo Rarámuri, por acercarme un poco a ellos y permitirme ayudarles. Dr. fue un honor trabajar con usted.

Al Dr. Víctor Chávez, por ser un excelente maestro, mentor y por compartir sus amplios conocimientos para formarme en la disciplina del CTV. Por creer en mí siempre y creer en este trabajo. Gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por su confianza y su amistad. Infinitamente gracias por ayudarme a culminar este sueño. Siga conservando esa luz y calidez en su alma. Es un honor y privilegio conocerlo y trabajar con usted.

A la Dra. Rachel Mata, por su paciencia, por sus consejos y por estar siempre al pendiente de mis avances. Le agradezco su confianza, su tiempo y el compartir sus conocimientos conmigo. Fue un honor trabajar con usted.

Agradezco profundamente a la Dra. Isabel Rivero, por su amabilidad, su tiempo y su dedicación en la parte fitoquímica. Por el gran apoyo y la amistad que me brindó en este corto tiempo. Gracias por regalarme siempre una sonrisa cálida.

Agradezco a la Dra. Josefina Herrera por enriquecer mi trabajo escrito, por seguir compartiendo sus conocimientos y sus enseñanzas que me llevan a analizar todo el panorama, desde todas las perspectivas posibles. Gracias Jose por seguir creyendo en mí.

A la Dra. Pilar Ortega, porque siempre fue muy atenta conmigo y se tomó el tiempo de enseñarme, un poco, del vasto conocimiento y experiencia que tiene de las micorrizas. Aprendí mucho de usted. Le agradezco muchísimo su dedicación y apoyo en esta parte de mi tesis, así como la confianza que me brindó. Gracias por enriquecer aún más mi trabajo. El honor fue todo mío.

Quiero agradecer al Dr. Martín García Varela por su interés, amabilidad y el apoyo durante toda la Maestría y el proceso de titulación. Agradezco a Rocío González Acosta por su disposición, apoyo y amabilidad para aligerar los trámites desde el inicio hasta el final de la Maestría.

A la M. en C. Iris Suárez Quijada, por el apoyo técnico brindado en la fase de micorrización. Gracias por su disposición, siempre tan amable, de apoyarme.

A la Biól. Bárbara Estrada, por la ayuda y la disponibilidad en el laboratorio que aligeró mi carga de trabajo. Gracias, muchas gracias Barbarita, por todo tu apoyo incondicional, por todos tus ánimos, por cada sonrisa, por tu amistad y calidez que me has brindado durante tantos años. Gracias por las tazas de café. Al Biól. Gabriel Olalde por los ánimos brindados.

A la Dra. Estela Sandoval, por su amable sonrisa y por el apoyo en cada plática. Gracias por el café.

Al Señor Raúl por su amabilidad e inmenso apoyo en cada momento.

Agradezco mucho a Oscar Juárez y Mieke Verhulst, así como a Felix Krengel, por la revisión del resumen en inglés.

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias por la oportunidad de aceptarme en esta maravillosa etapa de ser Profesora, por permitirme crecer profesional y personalmente a través de la enseñanza.

A todos mis alumnos que han cursado la Optativa (El Cultivo de Tejidos Vegetales como Herramienta Biotecnológica), gracias por enseñarme a ser una mejor profesora cada día, gracias por sus comentarios, su respeto y su paciencia. Son una fuente de inspiración para mí.

A todas aquellas personas que de una u otra forma dieron un paso al costado, porque también dejaron enseñanza en mi camino y eso me ha ayudado a crecer como persona.

A mis amigos del Lab. CTV por los bonitos momentos que hemos pasado juntos, por esas comidas tan amenas dentro y fuera del Lab, por todos los intercambios de ideas para enriquecernos como equipo y como personas. Por todo el apoyo y las alegrías que me han brindado. Los admiro a cada uno de ustedes.

A Miguel Garduño (cricket) y a Pablo, por la amistad que se ha forjado durante tanto tiempo. Por escucharme y por permitirme escucharlos. Gracias por los ánimos, por el apoyo y los innumerables consejos que han permitido despejar mi mente y corazón. Gracias amigos míos.

A mi profesora de yoga, Paty Andrade porque con tus enseñanzas profundas he entendido el valor y la importancia del aquí y el ahora, de este momento presente que me permite escucharme, entenderme y ser amable conmigo, para involucrarme en mi respiración y así, escuchar la vida.

A Gerardo Mora, por enseñarme a que el dolor se puede aminorar entendiéndolo y aceptándolo, pero no olvidándolo. Gracias por enseñarme a perdonar a las personas que me lastimaron, y gracias por liberarme de esa tristeza y rencor que estaban clavados en mi alma.

A Alejandra y Rossana, mis más grandes amigas. De cada una de ustedes he aprendido tanto de la libertad como del hermoso compromiso para con uno mismo y con los demás. Infinitas gracias por su apoyo incondicional, los ánimos, los mensajes, las risas, la confianza, por su amistad de tantos años y que aún se sigue forjando y cultivando cada día. Las quiero muchísimo! A Moni por su linda presencia.

Al pueblo Rarámuri (Tarahumaras), por confiarme tan valioso e importante recurso, para llevar a cabo este trabajo. Gracias por sus conocimientos del mundo natural y por saber tratar a la naturaleza con respeto y sabiduría. No tengo el enorme honor de conocerlos, pero merecen todo mi reconocimiento y gratitud.

A mi familia, por estar cerca y lejos, por los motivos que tengan, siempre están en mi corazón. Dios los bendiga en cada momento de su camino.

A mis queridas abuelitas a quienes extraño tanto, Carmen† y Dolores†, mis ángeles de la guarda, porque siguen cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi abuelito Amalio, porque siempre estás en pie de lucha. Por ser mi ejemplo de constancia y disciplina, por enseñarme que la vida no es fácil pero siempre hay que luchar por lo que uno quiere, teniendo un propósito y un ideal, el esfuerzo vale la pena. Gracias por bendecirme siempre. Tu alegría y tu sonrisa siempre me alivian. Te quiero muchísimo Abue.

A Mis Padres, Gustavo y Dolores, por sentar las bases de superación en mí para que siga construyendo mi propio camino, apoyándome en los valores que me han enseñado. Gracias por siempre estar ahí y apoyarme en cada paso y decisión que tomo. Los aciertos que tengo son gracias a ustedes por el amor y respeto incondicional que siempre me brindan. Los errores son solo míos, fallos que ustedes me dejan cometer para que pueda levantarme con más fuerza. Gracias por sus sacrificios y sus esfuerzos para que yo sea una mejor persona, una mejor mujer. Siempre los he admirado y siempre los he amado.

A mi hermano Gerardo, porque sigues teniendo ese noble y cálido corazón. Por la enorme fuerza y valor que tienes en el alma. Gracias por ser mi hermano mayor, por quererme, apoyarme y siempre estar ahí. ¡Te quiero mucho! A mis sobrinas queridas, Madai y Janai, siempre han sido las lucecitas en mi vida que me sacan de la oscuridad y me impulsan a seguir adelante.

A mi hermano Oscar (Oshkar) porque, aunque estés tan lejos, sigues apoyándome e involucrándote aún más en el mundo de la biología. Gracias por ayudarme siempre que lo necesito y por los puntos de vista tan objetivos que me hacen reflexionar. Gracias Mieke por hacer de mi hermano un hombre feliz. Te quiero y te extraño mucho hermanito.

A ti Octavio, porque solo tú sabes cómo escucharme a través del silencio y llegas a una parte de mi alma que nadie más puede ver. Gracias por ser mi pilar y el inmenso apoyo en mi vida; por abrirme tus brazos a la alegría y a la tristeza, en ellos siempre me reconforto. Gracias por escucharme, hablarme y confiar en mí. Por la enorme paciencia que tienes hacia mi persona, hacia mi alma y por el gran esfuerzo que siempre me brindas para que lo nuestro siga caminando. Gracias por tu complicidad, por ser mi amigo y al mismo tiempo mi amado. Gracias por amarme tal como soy. Cariño mío, tus virtudes infinitas y tu gran corazón me llevan a admirarte y a amarte cada día más!

A mí, porque hay partes rotas en mi ser, que me hacen entender la enorme fuerza que hay en mí, que me hacen anhelar algo más extraordinario en mi vida y seguir con paso firme hacia adelante. Wendy, estas donde necesitas estar, sólo respira.

DEDICATORIA

A ti SEÑOR

A mis padres:
Gustavo y Dolores

A mi hermano Gerardo, a Gaby
y a mis dos fuentes interminables de luz: Madai y Janai

A Oscar y Mieke

A Carmen† y Dolores†, mis abuelitas,
mis ángeles de la guarda

A mi abuelito Amalio

A mi gran familia

A ti Octavio

A Hagen 🐾

Porque fuiste un ángel que cayó del cielo para estar sólo conmigo
y me enseñó a ser un alma libre, mostrándome a mi existencia
lealtad, nobleza, consuelo, paciencia, alegría, tristeza, dolor,
cariño, esfuerzo, superación e inspiración.

Amaba que caminaras a mi lado, pero te dejé partir
y me quebré, me perdí, mi mente se nubló,
y aunque estas en mi corazón y en mi esencia,
será una larga vida, sin ti.

Tengo Fe en que cuando se corte el hilo de mi vida,
nos volvamos a encontrar en el puente del arcoíris.

Mi querido chabochito, te extraño cada instante.

Me haces mucha falta.

“La Tierra es una entidad viviente en evolución. Cada forma de vida en la Tierra es una parte importante de esta entidad viviente. En consecuencia, nosotros los miembros de la raza humana debemos de cultivar la consciencia de que somos parte de una comunidad global de vida y que todos compartimos una misión común y una responsabilidad por el futuro de nuestro Planeta. Crearemos un mundo en el cual cada persona esté consciente de que somos capaces de vivir con las bendiciones de la naturaleza y de vivir en armonía con ella, mostrando gratitud y respeto por todo animal, planta y cualquier otra forma de vida”

Mahatma Gandhi

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	5
A. La Familia Asteraceae	5
1. Tribu Coreopsideae (Less.) Turner & Powell	6
2. El Género <i>Cosmos</i> Cav.	6
3. Distribución geográfica del Género	8
4. Aprovechamiento del Género <i>Cosmos</i>	9
a. Usos de <i>Cosmos</i> spp. en la medicina tradicional	15
5. Estudios fitoquímicos realizados en el género <i>Cosmos</i>	16
B. Cultivo de Tejidos Vegetales	27
1. El Cultivo de Tejidos Vegetales como fuente de Metabolitos Secundarios	33
2. Cultivo <i>in vitro</i> en la familia Asteraceae	35
3. Cultivo <i>in vitro</i> en el género <i>Cosmos</i>	37
a. Características y distribución de <i>Cosmos pringlei</i> Rob. & Fern.	42
(1) Clasificación taxonómica y descripción botánica	42
(2) Distribución geográfica de la especie	44
(3) Usos medicinales de <i>C. pringlei</i>	44
(4) Estudios fitoquímicos reportados para la especie	45
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
III. HIPÓTESIS	49
IV. OBJETIVOS	50
Objetivo general	50
Objetivos particulares	50

V. MATERIALES Y MÉTODOS	52
A. Cultivo <i>in vitro</i>	52
1. Recolecta del material vegetal	52
2. Desinfección de aquenios	52
3. Pruebas de germinación <i>in vitro</i>	53
4. Germinación <i>in vitro</i>	53
5. Germinación en suelo	54
6. Inducción de regenerantes	54
7. Segunda inducción a callo	56
8. Individualización y enraizamiento	57
9. Aclimatización	57
a) Establecimiento de las plántulas en sustratos <i>in vitro</i>	57
b) Establecimiento de plántulas a condiciones <i>ex vitro</i>	59
10. Análisis estadístico	59
B. Análisis fitoquímico	60
1. Análisis químico	60
a. Secado del material vegetal	60
b. Método de extracción y fraccionamiento	60
c. Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina (CCF)	61
d. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	63
2. Actividad biológica	63
a. Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L.	63
b. Bioensayo de fitotoxicidad mediante el método bioautográfico.	64
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
A. Cultivo <i>in vitro</i>	66
1. Material biológico	66
2. Evaluación de la eliminación del pericarpio sobre la germinación <i>in vitro</i>	67
3. Establecimiento aséptico de los aquenios	69
4. Germinación <i>in vitro</i>	71

5. Germinación en suelo	75
6. Evaluación del efecto de las citocininas sobre el crecimiento de regiones apicales	75
7. Evaluación de la activación de las yemas axilares y el crecimiento de los brotes en nudos	83
8. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre hoja	90
9. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre entrenudos	97
10. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre raíz	104
11. Segunda inducción a callo	111
12. Evaluación del efecto del carbón activado sobre la formación de raíces en brotes	116
13. Aclimatización	120
a. Evaluación del establecimiento de plántulas sobre sustratos <i>in vitro</i>	120
b. Evaluación del establecimiento de plántulas a condiciones <i>ex vitro</i>	124
B. Análisis fitoquímico	128
1. Análisis químico	128
a. Obtención de extractos y fracciones	128
b. Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos	130
c. Análisis de los extractos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	132
2. Actividad biológica	135
a. Bioensayo de toxicidad con <i>A. salina</i>	135
b. Bioensayo de fitotoxicidad en <i>A. hypochondriacus</i>	135
CONCLUSIONES	139
PERSPECTIVAS	141
LITERATURA CITADA	142
APÉNDICES	160

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-γ-γ-dimetilamino-purina
4-cloro-AIA	4-cloro indol-3-acético
AcOEt	Acetato de etilo
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido α-naftalenacético
ANDEVA	Análisis de Varianza
BA	6-benciladenina
ca.	<i>Cerca de</i>
CA	Carbón activado
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CFT	Contenido de fenoles totales
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media
CL ₅₀	Concentración letal media
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EO	Extracto orgánico
g	Gramos
h	Hora
Hex	Hexano
HMA	Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares
kg	kilogramos
Kin	Kinetina
L	Litro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo

min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
ms	Metabolitos secundarios
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
PPM	Plant Preservative Mixture™
ppm	Partes por millón
PR	Poder de reducción
PVP	Polivinilpirrolidona
RBGK	Royal Botanic Gardens, Kew
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
seg	segundos
TDZ	Tidiazuron
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
WPM	Medio de cultivo Woody Plant Medium
μm	Micrómetros
μg	Microgramos
μM	Micromolar

RESUMEN

Cosmos pringlei (Asteraceae) es una especie endémica de México. Sus poblaciones son vulnerables debido al uso medicinal atribuido a la raíz tuberosa y a su comercialización en los mercados locales. Existe poca información fitoquímica y ninguna respecto a su propagación mediante cultivo de tejidos vegetales (CTV). El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones experimentales para la regeneración *in vitro* de *C. pringlei* y determinar la presencia de compuestos bioactivos en callos y regenerantes obtenidos. Se establecieron asépticamente el 80.5% de los aquenios en medio Murashige y Skoog (MS). La germinación *in vitro* fue del 51.72%, la cual comenzó a los 7 días de cultivo, en comparación con la germinación en suelo que fue del 48% y comenzó a los 14 días de cultivo; en ambas condiciones, la germinación se favoreció con la eliminación del pericarpio. Las regiones apicales y nudos se cultivaron en diferentes concentraciones de kinetina (Kin) y benciladenina (BA), los cuales indujeron la activación de yemas preformadas y promovieron el desarrollo de callo en la base de los explantes; sin embargo, la longitud del eje principal, así como la formación de raíces se inhibieron. Explantes de hojas, entrenudos y raíces se cultivaron en distintas concentraciones de ácido α -naftalenacético (ANA) en combinación con distintas concentraciones de BA. Los tratamientos con únicamente BA favorecieron la formación de brotes adventicios en los tres tipos de explantes. Las raíces produjeron el promedio más alto (0.62) de brotes. El callo se desarrolló en los tres tipos de explantes, aunque su cantidad fue escasa. El desarrollo de las raíces en los brotes regenerados, no presentó diferencias significativas entre el medio basal y en el que se adicionó carbón activado. Los resultados obtenidos en la etapa de aclimatización *in vitro*, arrojaron que la sobrevivencia de las plántulas se favoreció por la utilización del suelo en donde crece la especie, de igual forma sucedió en la fase de aclimatización *ex vitro*. En el análisis fitoquímico, los extractos obtenidos de las partes aéreas y raíces regeneradas *in vitro*; así como de callos de hoja, tallo y raíz, fueron comparados con los compuestos mayoritarios obtenidos a partir de raíces silvestres. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), detectó la presencia de seis compuestos en el extracto de callo de raíz, entre los cuales

se encontraron trazas de la deshidrocostuslactona y de la costunólida, compuestos bioactivos en las raíces silvestres de *C. pringlei*. De igual forma, en el extracto de las partes aéreas regeneradas *in vitro*, se detectaron trazas de la deshidrocostuslactona. Los bioensayos de toxicidad en *Artemia salina* y fitotoxicidad en *Amaranthus hypochondriacus* no fueron significativos en el extracto de partes aéreas provenientes de cultivos *in vitro*.

Este es el primer estudio que aporta un método de regeneración *in vitro*, que permite la producción continua de ejemplares para su estudio, conservación y aprovechamiento y que pueden ser ofrecidos como una alternativa a la recolección de individuos de las poblaciones naturales por parte de personas no pertenecientes a la comunidad Rarámuri. Además, se aporta una base para la una producción de compuestos bioactivos de interés agrobiológico.

ABSTRACT

Cosmos pringlei (Asteraceae) is an endemic species of Mexico. Its conservation status is vulnerable due to the unsustainable commercialization of the tuberous root of this medicinal plant on the local markets. There is little phytochemical information and no reports regarding plant tissue culture (PTC) in the scientific literature. The objective of this study was to establish the experimental conditions for the *in vitro* regeneration of *C. pringlei* and to determine the presence of bioactive compounds in callus and obtained regenerants. 80.5% of the achenes were aseptically established in Murashige and Skoog (MS) medium. Germination started earlier and showed a higher rate under *in vitro* conditions than in soil (7 vs 14 days of culture and 51.72 vs 48%, respectively). Elimination of the pericarp had a positive effect on germination in both cases. The apical regions and nodes were cultivated on MS medium containing different concentrations of kinetin (Kin) and benzyladenine (BA), which induced the activation of preformed buds and stimulated the development of callus at the base of the explants; growth of the main axis and root formation, however, were inhibited. Immature leaf, internode and root explants were cultivated on MS medium supplemented with different concentrations of α -naphthaleneacetic acid (NAA) and BA. The treatments containing only BA favored the formation of adventitious shoots in the three types of explants. The roots produced the highest average of shoots per explant (0.62). Callus developed on all explant types, although in low quantities. With respect to the development of roots in the regenerated shoots, grown in the basal medium with and without activated charcoal, no significant differences were observed. The results obtained in the *in vitro* and *ex vitro* acclimatization stages showed that the survival of the seedlings was favored by the use of soil taken from the natural environment of the species. In the phytochemical analysis, the extracts obtained from aerial parts and roots regenerated *in vitro*, as well as from immature leaf-, stem- and root-derived callus, were compared with the secondary metabolite profiles of wild roots. Six compounds were detected in the root-derived callus extract via gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Notably, traces of dehydrocostuslactone and costunolide were found, which are known to be bioactive

compounds in the roots of wild *C. pringlei* plants. Likewise, traces of dehydrocostuslactone were detected in the extracts of the *in vitro* regenerated aerial parts. However, these extracts did not show any significant cytotoxic or phytotoxic effects in *Artemia salina* and *Amaranthus hypochondriacus* bioassays, respectively.

This is the first study in providing an *in vitro* regeneration method that allows the continuous production of *C. pringlei* specimens for study, conservation and commercial purposes, thus offering an alternative to the harvesting of plants from natural populations by persons not belonging to the Rarámuri community. In addition, a new approach for the production of bioactive compounds of agrobiological interest is proposed.

INTRODUCCIÓN

México está considerado como el cuarto país con mayor diversidad vegetal a nivel mundial en términos de riqueza de especies, diversidad genética, tipos de vegetación y de germoplasma de plantas cultivadas (Soberón y Llorente, 1993). Esta diversidad se debe a la combinación de varios factores ambientales: la ubicación del país en una zona de transición entre dos reinos biogeográficos, el neártico y el neotropical; una accidentada orografía; una historia geológica de distintas épocas y la presencia de casi todos los climas del mundo (Carabias *et al.*, 1994).

Un recuento actualizado de las plantas con flores, estima una riqueza en más de 250 000 especies; y en México revela la existencia de 53 órdenes, 247 familias, 2 685 géneros y 21 841 especies y se considera que el porcentaje de endemismo en las plantas con flores es de 50.4% (11 001 especies) (Villaseñor y Ortiz, 2014). Esta abundancia de endemismos en la flora mexicana, asociada a su notable diversidad, es indicadora de que el territorio del país ha sido lugar de origen y desarrollo de un gran número de grupos de plantas (Alanís *et al.*, 2004).

En México, se calcula que alrededor de 4 000 especies (aproximadamente 18% de la flora total) de las 21 841 plantas con flores tienen atributos medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005). El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades es una actividad común y tradicional en muchas partes del mundo y en nuestro país se extiende desde tiempos prehispánicos (Taylor *et al.*, 2001; Bye, 1998). Se estima que dos tercios de la población mundial basa su salud en compuestos y preparados derivados de plantas para tratar una amplia variedad de padecimientos (Taylor *et al.*, 2001).

Más del 90% de las especies medicinales que son utilizadas hoy en día, provienen de la recolección silvestre (Chávez, 2009). Un aspecto importante en el uso y consumo de la flora silvestre es que tales prácticas acarrearán consecuencias negativas para su conservación, debido a que la producción para su venta no contribuye a la conservación

in situ, ya que al ser productos relativamente baratos se tiende a un alto índice de recolecta, lo cual no es sustentable para las especies (Vázquez *et al.*, 2004).

Aunado a lo anterior, la explotación comercial, la pérdida del hábitat ocasionado por la intensa tala de los bosques y el sobrepastoreo, la pérdida de la diversidad genética y extinciones locales, puede llevar localmente a la extinción de las poblaciones (Hawkins, 2008; Bye, 1998; Canter *et al.*, 2005).

La amenaza se incrementa cuando los principios activos se encuentran en la raíz, órgano importante por sus características de absorción, almacenamiento y anclaje o retención de suelo. Esto hace a las poblaciones naturales vulnerables debido a que la cosecha es destructiva. Es decir, la planta es arrancada totalmente de su hábitat, consecuentemente impidiendo su regeneración y subsiguiente propagación (Chávez, 2009).

En México, el número de especies de plantas medicinales con raíces útiles representan el 10% (Navarro y Avendaño, 2002). En la Sierra Tarahumara, las raíces medicinales del chuchupate (*Ligusticum porteri*), el matarique (*Psacalium decompositum*) y la bavisca (*Cosmos pringlei*) han sido sobre recolectadas para satisfacer los mercados tanto nacionales como extranjeros (Bye, 1998) y las poblaciones locales de la raíz de la cancerina (*Hippocratea excelsa*) han desaparecido de los bosques tropicales caducifolios (Barreto *et al.*, 1989).

Debido a la pérdida acelerada de las especies vegetales hay gran interés por desarrollar métodos eficientes para conservar el germoplasma, esto es, preservar con la mayor integridad posible toda la variabilidad disponible en una especie dada (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). La conservación efectiva del germoplasma vegetal requiere de la interacción de varias tecnologías (Fay, 1994). Con el desarrollo de las

técnicas de cultivo de tejidos es posible la conservación y el intercambio de germoplasma vegetal *in vitro* (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que, una vez superada la fase experimental, hace posible el control del desarrollo celular, así como dirigir sus respuestas morfogénicas y biosintéticas. Ha sido ampliamente utilizada para la propagación de un gran número de especies vegetales, como cíadas, agaves, cactáceas, orquídeas y helechos, incluyendo plantas medicinales, cuyos miembros han sido sobreexplotados o sus hábitats han sido alterados o 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 y obtener gran cantidad de individuos a corto y largo plazo (Rout *et al.*, 2000; Roca y Mroginski, 1991). Por otro lado, representa una herramienta valiosa para el estudio de los metabolitos secundarios ya que permite ser una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos (Verpoorte *et al.*, 2000), sin que las poblaciones silvestres se vean afectadas.

Entre la gran cantidad de plantas medicinales usadas en México, *Cosmos pringlei*, conocida como "bavisa" por los Rarámuri (pobladores de la Sierra Tarahumara), es una especie con una distribución restringida en el país, y de la cual se utiliza únicamente la raíz tuberosa para tratar diversos padecimientos como dolores estomacales, de muelas y de cabeza, también se utiliza para el tratamiento de disentería, úlcera gástrica, tos, hemorroides y para mejorar la circulación; por otro lado, las raíces en polvo se aplican tópicamente para limpiar heridas, situaciones que hacen que la especie sea arrancada de su ambiente natural. Asimismo, investigaciones realizadas por Mata y colaboradores (2002) permitieron demostrar su potencial fitotóxico. Debido a la sobrecolecta, por su gran valor medicinal y por su venta en los mercados locales de Chihuahua, su situación es crítica pues aún para los Rarámuri, les resulta difícil encontrar esta planta, que no obstante su valor ecológico, medicinal y cultural, no se cultiva.

Por las razones antes expuestas, es de vital importancia implementar estrategias para la conservación *in situ* y *ex situ* de *C. pringlei*; el CTV ha demostrado ser una alternativa de gran utilidad para el estudio, conservación y propagación rápida y masiva de especies vegetales; y de esta forma, reducir la presión de recolecta de las poblaciones silvestres. Con esto se podría mantener una producción continua de ejemplares de calidad para su estudio y uso sostenible, además de obtener compuestos bioactivos que produce esta especie y que pueden ser de interés agrobiológico. Para ello, los trabajos como el presente, son de suma importancia.

I. ANTECEDENTES

A. La Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (anteriormente Composite) es la más diversa de todas las angiospermas (Telleria, 2009). Constituye un grupo monofilético, organizado en 3 subfamilias y 17 tribus (Bremer, 1994). Cuenta con 1 700 géneros y cerca de 24 000-30 000 especies distribuidas por todo el mundo, en casi todos los ecosistemas terrestres con excepción de la Antártida, que incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m (Katinas *et al.*, 2007; Telleria, 2009).

Generalmente, las especies de esta familia se ven favorecidas por perturbaciones y son elementos abundantes en las primeras etapas sucesionales de comunidades vegetales secundarias y es común verlas dominando los medios arvenses y ruderales (Rzedowski y Rzedowski, 2001), algunos de sus miembros tienen relativa importancia económica como el girasol (*Helianthus annuus* L.), comestible como la lechuga (*Lactuca sativa*) y la alcachofa (*Cynara scolymus*), ornamental (p. ej. los géneros *Aster*, *Dahlia*, *Gerbera*, *Tagetes*) y medicinal como el estafiate (*Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*), árnica Mexicana (*Heterotheca inuloides*), zoapatle (*Montanoa tomentosa*), etc. (Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos, 2011; Villegas y de Gante, 1979; Tapia Muñoz, 2010; Heinrich *et al.*, 1998).

México, principalmente el Eje Neovolcánico Transversal, es uno de sus principales centros de diversificación y en su territorio se encuentra la concentración más cuantiosa de géneros y especies de todo el mundo (Ortiz-Bermudez *et al.*, 1998), con alrededor de 361 géneros y 3 021 especies, de estas últimas, más del 60% son endémicas (Soto-Trejo *et al.*, 2011). Un ejemplo al caso es la tribu Coreopsideae con más del 50% de los géneros en México (Vargas-Amado *et al.*, 2013).

1. Tribu Coreopsideae (Less.) Turner & Powell

Coreopsideae es una tribu perteneciente a la subfamilia Asteroideae. La circunscripción de la tribu Coreopsideae Lindley (1829: 1074), ha sido modificado por diversos autores (Panero y Funk, 2002; Kimball y Crawford, 2004; Mort *et al.*, 2008 y Crawford *et al.*, 2009, citado en Castro-Castro *et al.*, 2013). Sin embargo, la clara serie de filarias, los conductos resiníferos conspicuos visibles en las filarias internas y la presencia de flavonoides fueron reconocidos como caracteres de diagnóstico (Crawford y Stuessy, 1981; Robinson, 1981; Ryding y Bremer 1992, citado en Castro-Castro *et al.*, 2013), además de los estudios moleculares realizados (Kubitzki *et al.*, 1990).

La tribu cuenta con 24 géneros y 599 especies (**tabla 1**) (Crawford *et al.*, 2009). México cuenta con más del 50% de los géneros, esto es, 13 de los 24 (Panero y Funk, 2002; Crawford *et al.*, 2009). Además, 194 de las 599 especies se encuentran en México. A su vez, un buen ejemplo de la diversidad y endemismo en nuestro país es el género *Cosmos* Cav., uno de los grupos monofiléticos más diversos de la tribu (Vargas-Amado *et al.*, 2013).

2. El Género *Cosmos* Cav.

El género *Cosmos*, fue descrito por Antonio José de Cavanilles y Palop en 1791 (Mateo y Laguna, 2004). El nombre del género proviene de la palabra griega "κόσμος" que significa "orden" y por extensión hermoso o algo bello por el arreglo estilizado y armonioso de sus flores (Funk *et al.*, 2009). Se divide en tres secciones basadas en el hábito de crecimiento, en los caracteres del involucre y en la morfología del aquenio (Sherff 1932, 1955). Su clasificación y descripción se mencionan a continuación:

- 1) Sección *Cosmos* Sherff. Agrupa cinco especies anuales con cabezuelas de 8 flores liguladas de color blanco, violado o anaranjado y aquenios pubescentes de rostro largo.

Tabla 1. Géneros y número de especies pertenecientes a la Tribu Coreopsideae.

Género	Número de especies
<i>Trioncinia</i> (F. Muell.) Veldk.	1
<i>Selleophytum</i> Urban	1
<i>Petrobium</i> R. Br.	1
<i>Narvalina</i> Cass.	1
<i>Moonia</i> Arn.	1
<i>Henricksonia</i> B.L. Turner	1
<i>Goldmanella</i> (Greenm.) Greenm.	1
<i>Diodontium</i> F. Muell.	1
<i>Dicranocarpus</i> A. Gray	1
<i>Cyathomone</i> S.F. Blake	1
<i>Oparanthus</i> Sherff	4
<i>Hidalgoa</i> La Llave & Lex	5
<i>Fitchia</i> Hook. f.	6
<i>Ericentrodea</i> S.F. Blake & Sherff	6
<i>Coreocarpus</i> Benth.	7
<i>Heterosperma</i> Cav.	5-11
<i>Glossocardia</i> Cass.	12
<i>Isostigma</i> Less.	13
<i>Chrysanthellum</i> Rich.	13
<i>Thelesperma</i> Less.	15
<i>Dahlia</i> Cav.	35
<i>Cosmos</i> Cav.	36
<i>Coreopsis</i>	86
<i>Bidens</i> L.	340

2) Sección *Mesinenia* Sherff. Incluye ocho especies sufruticosas que producen cabezuelas con 5-8 flores liguladas de color blanco, violado o amarillo y aquenios pubescentes o glabros de rostro corto.

3) Sección *Discopoda* (DC.). Sherff. Está representada por 24 especies de hierbas perennes con tallos cilíndricos, rizomas, raíces tuberosas, de 8 a 10 filarias internos o externos, flores de color púrpura, violáceo o blancas, hispídas o glabras. Aquenios lisos o tuberculados sin picos bien definidos. Morfológicamente, la sección *Discopoda* es extremadamente variable. Con frecuencia, los caracteres vegetativos y reproductivos se superponen y hacen que sea difícil definir los límites de cada especie (Castro-Castro *et al.*, 2013; Vargas-Amado *et al.*, 2013). *C. pringlei* pertenece a esta sección.

3. Distribución geográfica del Género

Cosmos agrupa 35 especies y 4 variedades (**tabla 2**) (Vargas-Amado *et al.*, 2013). Es un género nativo de América. Su distribución geográfica se extiende desde el sureste de Estados Unidos de América, a través de México, hacia América del Sur a lo largo de los Andes hasta el norte de Argentina (**figura 1**). La mayoría de las especies crecen en bosques de pino y encino (Castro-Castro *et al.*, 2013).

México es uno de los principales centros de diversificación del género *Cosmos* y en su territorio se encuentra la concentración más numerosa de todo el mundo (Rodríguez *et al.*, 2006; Ortiz-Bermúdez *et al.*, 1998), con 33 especies y 4 variedades que crecen en el territorio nacional, excepto en Baja California y Yucatán. El estado con la mayor riqueza es Jalisco, con 19 taxa, seguido por Durango (12), el Estado de México y Guerrero, cada uno con 11. El resto de los estados tienen menos de 11 taxa y en Campeche, Quintana Roo y Tabasco se registró una sola especie (Vargas-Amado *et al.*, 2013).

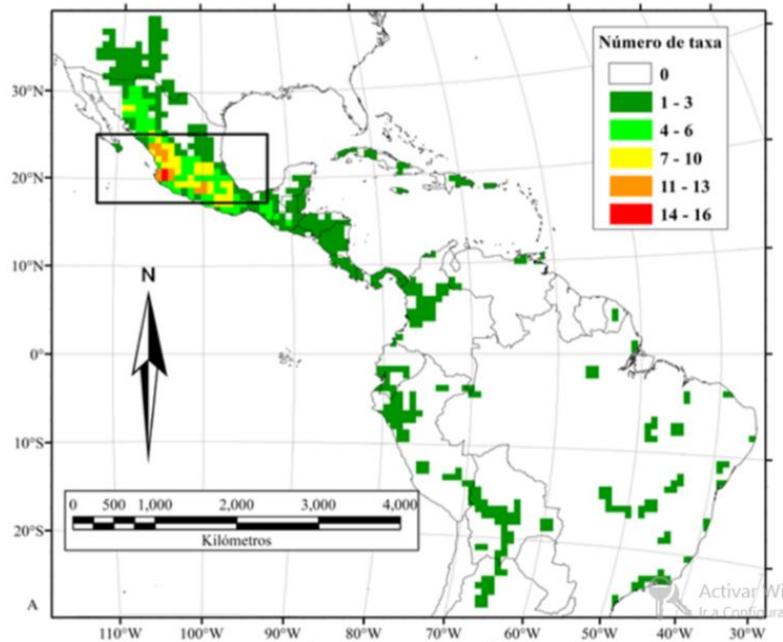


Figura 1. Distribución y riqueza del género *Cosmos* Cav. en el continente Americano (Tomado y modificado de Vargas-Amado *et al.*, 2013)

4. Aprovechamiento del Género *Cosmos* Cav.

Dentro de la familia Asteraceae, *Cosmos* Cav. es uno de los géneros arvenses con un mayor potencial ornamental, forrajero, alimenticio y medicinal.

El aprovechamiento del género se ha dirigido principalmente al uso ornamental, debido a que la característica principal es el color y la variación morfológica de las flores, por lo que muchas especies son potencialmente valiosas como plantas ornamentales (Rodríguez-Bernal *et al.*, 2013).

El género muestra una amplia adaptación a diversas condiciones climáticas y de altitud, prueba de ello es el hecho que cuando fue llevado de México a otros países, cambió su aspecto silvestre de plantas de más de un metro de altura, con flores pequeñas color magenta, carmesí o blanco; por plantas pequeñas con flores grandes, numerosas y con una gama mayor de colores (Ayala, 1997).

Tabla 2. Distribución y taxones del género *Cosmos* (Tomado de Castro-Castro, 2013).

Taxa	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
<i>Cosmos</i> sección <i>Cosmos</i>		
1. <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.	EUA, México y Guatemala	Aguascalientes, Chihuahua, Chiapas, Coahuila, D.F., Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas
<i>C. bipinnatus</i> Cav. var. <i>exaristatus</i> .	México	Michoacán
2. <i>C. caudatus</i> H.B.K. var. <i>caudatus</i> .	México, América Central, Antillas, América del Sur	Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas
<i>C. caudatus</i> H.B.K. var. <i>exaristatus</i> Sherff.	México	Michoacán
3. <i>C. pacificus</i> Melchert	México	Colima, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Sinaloa
4. <i>C. parviflorus</i> (Jacq.) Pers.	EUA, México	Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, D.F., Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Zacatecas

Tabla 2 continuación...

Taxa	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
5. <i>C. sulphureus</i> Cav. var. <i>sulphureus</i>	México, América Central	Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Chiapas, Colima, D.F., Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Veracruz, Yucatán, Zacatecas
<i>C. sulphureus</i> Cav. var. <i>exaristatus</i> Sherff.	México	Morelos, Oaxaca, Chiapas
<i>Cosmos</i> sección <i>Discopoda</i>		
6. <i>C. atrosanguineus</i> (Hook.) A. Voss	México	San Luis Potosí, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro
7. <i>C. concolor</i> Sherff.	México	Durango, Zacatecas
8. <i>C. deficiens</i> (Sherff) Melchert.	México	Jalisco
9. <i>C. diversifolius</i> Otto ex Knowles & Westc. var. <i>diversifolius</i> .	México y Guatemala	Chiapas, DF, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz
<i>C. diversifolius</i> Otto ex Knowles & Westc. var. <i>dahlioides</i> (S. Wats.) Melchert.	México	D. F.
<i>C. diversifolius</i> Otto. Ex. Knowles & Westc. var. <i>pumilus</i> Sherff.	México	Puebla, Veracruz
10. <i>C. jaliscensis</i> Sherff.	México	Jalisco

Tabla 2 continuación...

Taxa	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
11. <i>C. juxtlahuacensis</i> Panero & Villaseñor.	México	Oaxaca
12. <i>C. longipetiolatus</i> Melchert.	México	Jalisco
13. <i>C. mattfeldii</i> Sherff.	México	Michoacán, Guerrero
14. <i>C. mcvaughii</i> Sherff.	México	Jalisco
15. <i>C. modestus</i> Sherff.	México	Estado de México
16. <i>C. montanus</i> Sherff var. <i>montanus</i> .	México	Durango, Jalisco, Zacatecas, Nayarit
<i>C. montanus</i> Sherff var. <i>pinnatus</i> Sherff.	México	Nayarit
17. <i>C. nelsonii</i> Rob. & Fern.	México	Oaxaca
18. <i>C. nitidus</i> Paray	México	Estado de México
19. <i>C. palmeri</i> B. L. Rob. var. <i>palmeri</i> .	México	Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas
<i>C. palmeri</i> B. L. Rob. var. <i>odontophyllus</i> Sherff.	México	San Luis Potosí
20. <i>C. peucedanifolius</i> Wedd. var. <i>peucedanifolius</i> .	Bolivia, Perú	-----
<i>C. peucedanifolius</i> Wedd. var. <i>cochabambensis</i> (O. Ktze.) Sherff.	Bolivia	-----
<i>C. peucedanifolius</i> Wedd. var. <i>tiraquensis</i> (O. Ktze.) Sherff.	Bolivia, Perú	-----
21. <i>C. pringlei</i> Rob. & Fern.	México	Chihuahua, Durango, Nayarit, Guanajuato
22. <i>C. pseudoperfoliatus</i> Art. Castro, M. Harker & Aaron Rodr.	México	Jalisco

Tabla 2 continuación...

Taxa	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
23. <i>C. purpureus</i> (DC.) Benth & Hook.f. ex Hemsl. var. <i>purpureus</i> .	México	Guerrero, Morelos, Estado de México, Veracruz
<i>C. purpureus</i> (DC.) Benth & Hook.f. ex Hemsl. var. <i>flavidiscus</i> Sherff.	México	Estado de México
24. <i>C. ramirezianus</i> Art. Castro, M. Harker & Aaron Rodr.	México	Jalisco
25. <i>C. scabiosoides</i> H.B.K. var. <i>scabiosoides</i> .	México	Chiapas, D.F., Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Veracruz, Zacatecas
<i>C. scabiosoides</i> H.B.K. var. <i>oblongus</i> Sherff.	México	Michoacán
26. <i>C. schaffneri</i> Sherff.	México	D.F., Guerrero
27. <i>C. sessilis</i> Sherff.	México	Jalisco
28. <i>C. sherffii</i> Melchert	México	Oaxaca
29. <i>C. stellatus</i> Sherff.	México	Michoacán, Jalisco
<i>Cosmos</i> sección <i>Mesinenia</i>		
30. <i>C. carvifolius</i> Benth.	México	Durango, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán
31. <i>C. crithmifolius</i> H.B.K.	México, América Central	Aguascalientes, Chiapas, D.F., Durango, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Zacatecas
32. <i>C. intercedens</i> Sherff.	México	Nayarit, Jalisco

Tabla 2 continuación...

Taxa	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
33. <i>C. landii</i> Sherff var. <i>landii</i> .	México	Jalisco
<i>C. landii</i> Sherff var. <i>achalconensis</i> Melchert.	México	Jalisco
34. <i>C. linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl. var. <i>linearifolius</i>	México	Chihuahua, Durango, Nayarit, Sinaloa, Sonora
<i>C. linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl. var. <i>maysilesii</i> Sherff	México	Durango
<i>C. linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl. var. <i>magnifolius</i> Sherff	México	Chihuahua
35. <i>C. ochroleucoflorus</i> Melchert	México	Durango, Jalisco, Nayarit

Las semillas de *C. bipinnatus* fueron recolectadas por Sessé y Mociño durante la Expedición Real a Nueva España y luego llevadas a Madrid donde fueron cultivadas en el Jardín Botánico. Con base en estas plantas, el género *Cosmos* fue descrito con este nombre por la belleza de sus flores. También para el año 1790, *C. sulphureus* estaba en ese jardín. *C. diversifolius* y *C. atrosanguineus* (cosmos chocolate) son especies perennes cultivadas, pero no tan comunes (Rodríguez *et al.*, 2006). Esta última especie, tiene una gran popularidad debido al color rojo o marrón-carmesí de sus flores con un ligero aroma a chocolate, aunque en la actualidad, no se ha encontrado en estado silvestre (Kanellos y Pearson, 2000; Rodríguez *et al.*, 2006; Oku *et al.*, 2008).

Actualmente, algunas especies como *C. sulphureus*, *C. bipinnatus*, *C. caudatus*, y *C. diversifolius* son comercializadas como plantas de jardín en diferentes países de Europa y Asia; en donde también, se han desarrollado nuevas variedades (Rodríguez-Bernal *et al.*, 2013; Hind, 2005; Starman *et al.*, 1995). En México, el uso ornamental del género *Cosmos* no es tan común como en otros países donde es costumbre sembrar plantas ornamentales anuales cada año (Rodríguez *et al.*, 2006).

Por otro lado, *C. bipinnatus* tiene uso forrajero (Estado de México) y alimenticio. Las semillas de esta especie contienen más de 16% de ácidos grasos (Nigam y Misra, 1992 en Santamarina, 2006). También se ha encontrado, en estudios de laboratorio, que los extractos de la flor, producen tintes en tonos amarillos y cafés por la presencia de antocianinas (Ungureanu *et al.*, 1991).

C. caudatus, comúnmente conocida como *Ulam Raja* (Ensalada del Rey) en Malasia, se utiliza como saborizante en los alimentos y como brebaje en la medicina tradicional. Su olor atractivo, singular aroma y sabor añaden diversidad a los alimentos en donde la hierba se come normalmente cruda. Por otro lado, algunos estudios medicinales y nutricionales han demostrado que *C. caudatus* es una rica fuente de compuestos bioactivos incluyendo flavonoides, carbohidratos, fenoles, minerales, proteínas y vitaminas, incrementando su valor nutricional (Bunawan *et al.*, 2014).

a. Usos de *Cosmos* spp. en la medicina tradicional

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades es una actividad común y tradicional en muchas partes del mundo. Hoy en día, se estima que más de dos tercios de la población mundial, basa su salud en compuestos derivados de plantas para tratar una amplia variedad de padecimientos (Taylor *et al.*, 2001). De esta forma, algunos miembros del género *Cosmos*, son conocidos por su uso en la medicina tradicional.

El cocimiento de las flores de la especie *C. sulphureus* se utiliza en las prácticas médicas populares para combatir los efectos del piquete de alacrán (Martínez, 1979).

C. bipinnatus se emplea como tisana para aliviar molestias de la tos (Guerrero) y tiene efecto antiinflamatorio (Guanajuato y Estado de México) (Ungureanu *et al.*, 1991).

Hind (2005) menciona que *C. peucedanifolius* se utiliza para curar la neumonía, la infusión de las flores se puede utilizar como antipirético (es decir, para reducir la fiebre) o como sudorífico (para promover la sudoración).

Todas las partes de *C. caudatus* se utilizan con propósitos medicinales. Los extractos de esta hierba se utilizan para disminuir la densidad ósea, mejorar la circulación y para disminuir la presión alta. Además, las hojas y los tallos crudos son consumidos, tradicionalmente por los Malayos, para mejorar y curar enfermedades infecciosas y como agente anti-envejecimiento (Bunawan *et al.*, 2014).

Como se menciona anteriormente, las plantas han sido utilizadas durante siglos por diversos grupos humanos para tratar diversos padecimientos ya que representan la principal fuente de productos naturales que producen efectos terapéuticos importantes en el cuerpo humano. Estos productos naturales o metabolitos secundarios representan un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos (Rao y Ravishankar, 2002).

5. Estudios fitoquímicos realizados en el género *Cosmos*

Los compuestos que han sido caracterizados mediante el análisis fitoquímico realizado particularmente *C. bipinnatus*, *C. sulphureus*, *C. pringlei* y *C. caudatus*, pertenecen a los grupos de los fenoles, terpenoides, poliacetilenos y esteroides. Los compuestos aislados y las categorías a las que pertenecen éstos se observan en las **tablas 3, 4 y 5**, así como otros compuestos aislados en el género se presentan en la **tabla 6**.

Tabla 3. Fenoles aislados del género *Cosmos*

Fenoles	Compuesto	Especie	Referencia
Ácido fenólico	Ácido clorogénico	<i>C. caudatus</i>	Shui <i>et al.</i> , 2005; Andarwulan <i>et al.</i> , 2012
		<i>C. bipinnatus</i>	Saito, 1979
	Ácido criptoclorogénico	<i>C. caudatus</i>	Shui <i>et al.</i> , 2005
			Andarwulan <i>et al.</i> , 2012
		<i>C. bipinnatus</i>	Saito 1979
		Ácido neoclorogénico	<i>C. caudatus</i>
Fenilpropanoides	1-(1'-acetoxi-2'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		Fuzzati <i>et al.</i> , 1995
	1-(1', 2'-epoxi-3'-[(2''-metil)]-butiriloxi-propano)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		
	1-(3'-acetoxi-1'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		
	1-(1', 2'-epoxi-3'-acetoxi-propano)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		
	1-(1', 2'-epoxi-3'-isobutiloxi-propano)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno	<i>C. pringlei</i>	Rivero-Cruz, 2000
	"	<i>C. caudatus</i>	Fuzzati <i>et al.</i> , 1995
	1-(1', 2'-dihidroxi-3'-isobutiloxi-propano)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		
	1-(1'-isobutiloxi-2'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno	<i>C. pringlei</i>	Rivero-Cruz, 2000
	1-(1'-isovaleriloxi-2'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiloxi-benceno		

Tabla 3 continuación...

Fenoles	Compuesto	Especie	Referencia
	Z-coniferil alcohol-3'-acetil-4- <i>isobutirato</i>	<i>C. caudatus</i>	Sutarjadi <i>et al.</i> , 1995
	1',2'-dihidroxi-coniferil alcohol- 3'- <i>isobutiril</i> -4- <i>isobutirato</i>		
	1'-acetoxi-eugenol-4- <i>isobutirato</i>		
	1',2'-epoxi-Z-coniferyi alcohol-3'- (2-metilbutiril)-4- <i>isobutirato</i>		
	1',2'-epoxi-Z-coniferil alcohol-3'- acetil-4- <i>isobutirato</i>		
	1',2'-epoxi-Z-coniferil alcohol-3'- <i>isobutiryi</i> -4- <i>isobutirato</i>		
Chalcona	Buteína	<i>C. sulphureus</i> <i>C. bipinnatus</i>	Bohm, 1975
Tanino	Procianidina	<i>C. bipinnatus</i>	Bate-Smith, 1980
Flavonoides	Corepsina	<i>C. sulphureus</i> <i>C. bipinnatus</i>	Shimokoriyama y Geissman, 1960
	Sulfureína	<i>C. sulphureus</i> <i>C. bipinnatus</i>	Bohm, 1975
	Quercetina	<i>C. caudatus</i>	Abas <i>et al.</i> , 2003; Mustafa <i>et al.</i> , 2010; Mediani <i>et al.</i> , 2012; Andarwulan <i>et al.</i> , 2012; Andarwulan <i>et al.</i> , 2010
	Luteolina		Mustafa <i>et al.</i> , 2010; Andarwulan <i>et al.</i> , 2010
	Luteolina-3-glucurónido	<i>C. bipinnatus</i>	Saito, 1974
	Naringenina	<i>C. caudatus</i>	Mustafa <i>et al.</i> , 2010

Tabla 3 continuación...

Fenoles	Compuesto	Especie	Referencia
	Naringenina	<i>C. bipinnatus</i>	Chabannes y Pacheco, 1971
	Quercetina 3-O- β -arabinofuranosido	<i>C. caudatus</i>	Abas <i>et al.</i> , 2003; Mediani <i>et al.</i> , 2012
	Quercetina 3-O- α -ramnósido		
		<i>C. bipinnatus</i>	Kaneta <i>et al.</i> , 1978
	Quercetina 3-O- β -glucósido	<i>C. caudatus</i>	Abas <i>et al.</i> , 2003; Mediani <i>et al.</i> , 2012
	Quercetina-3-glucoglucurónido	<i>C. bipinnatus</i>	Chabannes y Pacheco, 1971
	Rutina	<i>C. caudatus</i>	Sukrasno <i>et al.</i> , 2011; Abas <i>et al.</i> , 2003; Mediani <i>et al.</i> , 2012;
	Catequina		Shui <i>et al.</i> , 2005; Mustafa <i>et al.</i> , 2010
	Kaempferol		Mustafa <i>et al.</i> , 2010; Andarwulan <i>et al.</i> , 2012
	Trifolina	<i>C. bipinnatus</i>	Saito, 1974
	Epicatequina	<i>C. caudatus</i>	Mustafa <i>et al.</i> , 2010
	Miricetina		Sukrasno <i>et al.</i> , 2011; Mustafa <i>et al.</i> , 2010; Andarwulan <i>et al.</i> , 2010
	Apigenina		Andarwulan <i>et al.</i> , 2010
		<i>C. bipinnatus</i>	Chabannes y Pacheco, 1971

Tabla 3 continuación...

Fenoles	Compuesto	Especie	Referencia
	Prunina		
	Crisoeriol-7-glucurónido		Saito, 1974
	Catequina	<i>C. caudatus</i>	Mediani <i>et al.</i> , 2012
	Quercetina 3-O-glucósido		Shui <i>et al.</i> , 2005
	Quercetina pentosa		
	Quercetina deoxil-hexosa		
Flavonas	Apigenina-7-O-glucósido		Kaneta <i>et al.</i> , 1978
	Quercitina	<i>C. caudatus</i> <i>C. bipinnatus</i>	Sukrasno <i>et al.</i> , 2011 Kaneta <i>et al.</i> , 1978

Tabla 4. Terpenoides aislados de *Cosmos* spp.

Terpenoides	Compuesto	Especie	Referencia	
Monoterpenoides	(E)-ocimeno	<i>C. caudatus</i>	Lee y Vairappan, 2011	
	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno			
Lactonas sesquiterpénicas	costunólida	<i>C. sulphureus</i>	Bohlmann <i>et al</i> , 1964	
		<i>C. pringlei</i>	Cuevas-Garibay, 1997	
	dehidrocostuslactona			
	15-isovleriloxi-costunólida			
	3β-isobutiriloxi- dehidrocostuslactona		Rivero-Cruz, 2000	
	11β- dihidrodehidrocostuslactona			
	15-isobutiriloxi-costunólida		Cuevas-Garibay, 1997	
	3β-isovaleriloxi- dehidrocostuslactona		Rivero-Cruz, 2000	
	Triterpenoides	Helianol	<i>C. bipinnatus</i>	Akihisa <i>et al</i> , 1996
	Sesquiterpenoides	α -Copaeno	<i>C. caudatus</i>	Lee y Vairappan, 2011
β -elemeno				
Cariofileno				
α -humuleno				
?-cadineno				
Bergamoteno				
β -selineno				
Biclogermacreno				
α -farneseno				
ä-cadineno				
?-muuroleno				

Tabla 4 continuación...

Terpenoides	Compuesto	Especie	Referencia
Sesquiterpenoides	Ácido butanedioico, metil-bis (1-metilpropil) ester	<i>C. caudatus</i>	Lee y Vairappan, 2011
	(-)-espatulenol		
	Oxido de cariofileno		
	α -Cadinol		
Diterpenoides	Fitol		

Tabla 5. Poliacetilenos aislados del género *Cosmos*

Poliacetileno	Especie	Referencia
1, 3, 11-tridecatrien-5, 7, 9-triino	<i>C. hybridus</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1964.
2, 10, 12-tridecatrien-4, 6, 8-triin-1-ol		
2, 10, 12-tridecatrien-4, 6, 8-triin-1-al	<i>C. sulphureus</i>	
1-acetoxi-2, 10, 12-tridecatrien-4, 6, 8-triino		
1, 3, 5, 11-tridecatetraen-7, 9-diino		
1-acetoxi-3-oxo-8, 10, 14, 16-octadecatetraen-12-ino		
1, 11-tridecadien-3, 5, 7, 9-tetraino	<i>C. diversifolius</i>	
2, 12-tridecadien-4, 6, 8, 10-tetraen-1-al		
1-acetoxi-2, 12-tridecadien-4, 6, 8, 10-tetraino		
2, 12-tridecadien-4, 6, 8, 10-tetraen-1-ol		
2, 6-dimetil-1, 3, 5, 7-octatetraeno	<i>C. bipinnatus</i> <i>C. caudatus</i>	

Tabla 6. Otros compuestos obtenidos de *Cosmos* spp.

Otros	Compuesto	Especie	Referencia
Carbohidratos	β -glucosa	<i>C. caudatus</i>	Mediani <i>et al.</i> , 2012
	α -glucosa		
	Sacarosa		
Aminas	Ácido fórmico		
Sales de amonio cuaternarias	Colina		
Ácidos carboxílicos	Alanina		
	Valina		
Esteroides	3 β -hidroxi-5 α -pregn-16-en-20-ona	<i>C. pringlei</i>	Cuevas-Garibay, 1997

Los estudios para evaluar la eficacia medicinal de las distintas especies o su potencial terapéutico han sido poco explorados. Los escasos estudios se han enfocado a *C. bipinnatus* (actividad antioxidante y efecto antígenotóxico), *C. pringlei* (actividad tóxica en *Artemia salina* Leach y actividad fitotóxica) y *C. caudatus* (actividad antioxidante, actividad antifúngica, actividad antibacteriana, efecto antiosteoporosis, efecto antihipertensivo, actividad antidiabética y toxicológica).

Fuzzati y colaboradores (1995) evaluaron diversos fenilpropanoides aislados a partir de *C. caudatus*, estos compuestos poseen actividad antifúngica contra *Cladosporium cucumetinum* y *Candida albicans*. Por otro lado, Rasdi y colaboradores (2010) demostraron que los extractos crudos de hexano, éter dietílico y etanol, a partir de hoja, inhibieron el desarrollo de *Candida albicans*.

No sólo se ha evaluado la actividad fungicida de *C. caudatus* en cepas patógenas en humanos; sino también, en patógenos seleccionados de plantas, el extracto crudo de hoja se separó en hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y una fracción acuosa. La

fracción de AcOEt mostró una mayor actividad antifúngica que el resto de las fracciones, de 4.7% a 52%. La inhibición más alta se observó en *Phytophthora palmivora* (*Theobroma cacao*) (52%), *Colletotrichum gloeosporioides* (*Carica papaya*) (23.5%) y *C. gloeosporioides* (*Mangifera indica*) (18%). También se encontró, que la fracción de AcOEt tiene una alta actividad para inhibir el crecimiento y la germinación de las esporas de *P. palmivora*. Por lo tanto, la fracción de AcOEt puede ser potencialmente utilizada para desarrollar un producto biopesticida para el control de la enfermedad de la vaina negra (Bunawan *et al.*, 2014).

Asimismo, se han realizado estudios de la actividad antibacteriana en *C. caudatus*. Una investigación llevada a cabo por Rasdi y colaboradores (2010) evaluaron los extractos crudos de Hex, éter dietílico, etanol y el buffer fosfato salino de *C. caudatus* sobre cuatro cepas, dos bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y dos bacterias gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*). Los tres primeros extractos mostraron actividad contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*; sin embargo, el extracto del buffer fosfato salino no presentó actividad bactericida contra *B. subtilis* ni *S. aureus*.

Estudios realizados por Lee y Vairappan (2011) determinaron que el extracto etanólico de *C. caudatus* era activo contra varias cepas de bacterias patógenas al humano como: *Salmonella* sp, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio cholerae*.

En *C. caudatus* también se ha reportado actividad antioxidante. Se llevó a cabo un experimento en el que se obtuvieron 37 extractos de verduras crudas utilizando diferentes sistemas de disolventes: 70% de acetona, 70% de metanol, 70% de etanol y agua destilada. Se obtuvo el mayor contenido de flavonoides a partir de 70% de extracto metanólico de *C. caudatus* (27.7 ± 1.0 mg QE/g de peso seco). Se espera que esto tenga efectos positivos para la prevención de enfermedades degenerativas. También se

encontró que *C. caudatus* posee la mayor cantidad de fenoles totales entre once hortalizas indonesias analizadas con 1.52 mg GAE/100 g de peso fresco. Se cree que los compuestos fenólicos son el principal contribuyente de la actividad antioxidante en extractos de plantas. En otro estudio, se evaluaron los extractos metanólicos de 21 plantas tropicales mediante el uso del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). *C. caudatus*, con CI_{50} 21.3 $\mu\text{g/mL}$, mostró el mayor potencial. También se observó que el extracto de *C. caudatus* se comportó de forma similar al α -tocoferol o BHA. Todos estos hallazgos apoyan el uso tradicional de *C. caudatus* para efectos antioxidantes y sugieren su uso potencial para el desarrollo apropiado de fármacos (Bunawan *et al.*, 2014).

Jang y colaboradores (2008) evaluaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de las flores de *C. bipinnatus*, de acuerdo a cuatro diferentes colores (blanco, rosa, naranjada y violeta). Las propiedades antioxidantes se evaluaron mediante cuatro diferentes tipos de ensayos. El contenido de fenoles totales (CFT) más alto, se observó en el color violeta, pero la CI_{50} de los ensayos DPPH RSA, ABTS RSA y el poder de reducción (PR) fueron los más bajos para este color. El DPPH RSA más alto se observó en el extracto de flores blancas. El ABTS RSA más alto se observó en las flores naranjas y en el PR, las flores blancas observaron mayor actividad.

C. caudatus puede ser usada como un medicamento alternativo para tratar la osteoporosis causada por la menopausia usando parámetros celulares y dinámicos de la histomorfometría ósea. Un experimento con el uso de ratas Wistar mostró que *C. caudatus* causó un aumento en la superficie osteoblástica y en el volumen del osteoide. La hierba también produjo mejores resultados en el volumen osteoide comparado con 1% de calcio. Basándose en esto, se puede concluir que *C. caudatus* a una dosis de 500 mg/kg puede ser un tratamiento alternativo para el daño óseo que puede ocurrir en mujeres post-menopáusicas. Por otro lado, se determinaron los efectos benéficos de *C. caudatus* como un agente protector del hueso en un experimento con ratas con osteoporosis post-menopáusicas. El experimento demostró el potencial de *C. caudatus*

(dosis de 500 mg/kg) para revertir el daño óseo inducido por la ovariectomía (Bunawan *et al.*, 2014).

El extracto acuoso de hojas silvestres de *C. caudatus* se ensayó en ratas que habían sido sometidas a tratamientos con cloruro de sodio y adrenalina para probar el efecto antihipertensivo de esta hierba. Los resultados demostraron que este extracto, a dosis de 500 o 1 000 mg/kg⁻¹, tuvo efectos benéficos tanto en la frecuencia cardíaca como en la amplitud del volumen sistólico inducido por la adrenalina, ya que bloqueó el aumento de ambos factores (Bunawan *et al.*, 2014; Amalia *et al.*, 2012).

Loh y Hadira (2011) analizaron la actividad antidiabética en extractos de *C. caudatus*. En comparación con el extracto de diclorometano (CH₂Cl₂), los extractos de Hex mostraron mayor actividad inhibitoria. Además, el extracto de CH₂Cl₂ no demostró ninguna actividad inhibitoria de la α -glucosidasa. Los autores concluyeron que *C. caudatus* tiene un buen perfil inhibitorio frente a las enzimas moduladoras de carbohidratos que están conectadas a la absorción de glucosa en el intestino.

Un estudio toxicológico encontró que el extracto etanólico de *C. caudatus* contra células de leucemia murina P388, tuvieron una actividad citotóxica débil (CI₅₀ de 25 μ g/mL). Además, se realizó un estudio de toxicidad aguda utilizando ratas macho. Los resultados obtenidos concluyeron que *C. caudatus* puede causar hepatotoxicidad aguda cuando se consume en dosis altas (Norazlina *et al.*, 2013).

B. Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta multidisciplinaria que basada en la totipotencialidad celular ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro* órganos, tejidos, células, embriones y plántulas que, en un medio de composición química definida (medio nutritivo, pH, reguladores de crecimiento, etc.) e incubarlos en condiciones ambientales controladas (luz, temperatura, atmósfera, etc.), es posible dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células, pudiendo lograr una gran variedad de objetivos como: investigación básica, mejoramiento genético, conservación de germoplasma, obtención de plantas libres de patógenos, micropropagación, obtención y producción de compuestos primarios y secundarios, etc. (Chávez, 1993; Roca y Mroginski 1991).

Para alcanzar los objetivos anteriores, diferentes autores concuerdan en que el éxito en la morfogénesis y crecimiento *in vitro* está determinado por una serie de factores complejos (Pérez *et al.*, 1999; Pierick, 1990; Roca y Mroginski, 1991). Uno de estos factores es la elección del explante, el cual está determinado por el objetivo perseguido (Jiménez, 1998); así como su tamaño, edad fisiológica y la manera en la cual es cultivado (George *et al.*, 2008). La asepsia es otro factor importante, se debe evitar la contaminación microbiana ya que puede ser el paso limitante para el establecimiento del cultivo. Otro factor son las condiciones del cultivo; por un lado, se encuentra la elección del medio en el cual pueden variar sus componentes como los nutrientes orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), fuentes de carbono y agentes gelificantes (Razdan, 2003; Beyl, 2005), así como la adición de suplementos orgánicos como el polivinilpirrolidona (PVP) (antioxidante) y carbón activado (George *et al.*, 2008) y por último las condiciones de incubación (la luz, la temperatura, el pH, etc.) (Pierick, 1990) que determinaran las respuestas que se obtengan *in vitro*

En el cultivo *in vitro* se exploran las condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética, manipulando las concentraciones endógenas y exógenas de RCV. Los RCV más utilizados para ello son las auxinas y las citocininas ya que se utilizan para la inducción de callo y permiten dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células (Chávez, 1993).

Muchos aspectos en la desdiferenciación/rediferenciación celular y, posteriormente en la morfogénesis de los cultivos *in vitro*, han demostrado ser controlados por una interacción entre las concentraciones de auxinas y citocininas (George *et al.*, 2008).

Las auxinas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular de naturaleza indólica. Regulan la ramificación del tallo, la formación del eje embrionario, la respuesta a los tropismos, el desarrollo del tejido vascular, el fototropismo, la filotaxia, la dominancia apical, la emergencia de raíces laterales y el desarrollo de pelos radicales y la morfogénesis del fruto y de la flor (Garay-Arroyo *et al.*, 2014).

La auxina natural comúnmente detectada es el ácido indol-3-acético (AIA); pero la presencia endógena del 4-cloro indol-3-acético (4-cloro-AIA) y el ácido 3-indol butírico (AIB) también se han demostrado, su biosíntesis es intensa en las regiones meristemáticas y órganos jóvenes en crecimiento (yemas apicales, ápices radicales, hojas, flores, frutos y semillas inmaduras). También existen auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y el ácido *n*-naftalenacético (ANA) que tienen diferentes estructuras pero similares propiedades biológicas (George *et al.*, 2008).

En el CTV, las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces, promover la formación de brotes adventicios, inducción de callo y frecuentemente organogénesis en cultivos en suspensión (Razdan, 2006).

Las citocininas tienen en su estructura un anillo de adenina con una cadena lateral de carbonos de isopentenil (Pimienta *et al.*, 2006). Sus principales actividades son: promover la síntesis de proteínas y controlar el ciclo celular, además promueven la

maduración de los cloroplastos y retrasan la senescencia de las hojas, promueven la movilización de nutrientes, el metabolismo autotrófico, la expansión de hojas y cotiledones y la interrupción de la dormancia de yemas (Taiz y Zeiger, 2006).

Los niveles de citocininas son máximos en órganos jóvenes (semillas, frutos y hojas) y en el ápice de la raíz (Pimienta *et al.*, 2006). La citocinina más abundante en la mayoría de las plantas es la *trans*-zeatina y en menor cantidad la *cis*-zeatina, la dihidrozeatina y 6- γ - γ -dimetilamino-purina (2iP). También existen citocininas sintéticas como la 6-benciladenina (BA), *orto* y *meta*-topolinas y kinetina (Kin) (Taiz y Zeiger, 2006).

En cultivo de tejidos, 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 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, promueven la producción de auxinas, permitiendo así, la proliferación celular regulada por ambas fitohormonas, haciendo evidente la relación proporcional que entre estas debe existir y que permite controlar el ciclo y el control de la diferenciación celular. La adición de citocininas también inhibe la formación de raíces, y en bajas concentraciones es capaz de inducir la formación de callos embriogénicos (George *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la proliferación de las plántulas a partir de los explantes en el cultivo *in vitro*, puede lograrse mediante varios factores como el medio de cultivo previamente establecido, por el uso de fitohormonas o reguladores de crecimiento (factores químicos), por los factores físicos y un adecuado manejo en el proceso *in vitro*. De esta forma, es útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas *in vitro* de la siguiente manera:

* ***Etapa 0. Selección y preparación de la planta madre.***

Etapa en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madre que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*, por lo tanto, se recomienda mantener a las plantas donadoras en las mejores condiciones sanitarias y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (González *et al.*, 2012).

* ***Etapa 1. Establecimiento aséptico de los cultivos.***

Los explantes deben 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 2. Multiplicación del tejido.***

Esta etapa comprende dos periodos, la fase de inducción, que implica concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento para favorecer la dediferenciación y la fase de multiplicación, en donde el empleo de un balance hormonal adecuado favorece los procesos de diferenciación y multiplicación celular (Olmos *et al.*, 2010). La finalidad de esta etapa es generar, mantener y aumentar la cantidad de estructuras o propágulos a partir de los explantes que, al ser individualizados, sean capaces de formar plantas completas o bien, mantener un nuevo ciclo de multiplicación (George *et al.*, 2008). Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*.

- a) ***Organogénesis:*** es la formación *de novo* de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejido no meristemático, los cuales se generan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios con

concentraciones elevadas de citocininas. Formación de órganos adventicios como tallos, raíces u hojas (Jiménez, 1998).

- b) *Embriogénesis somática, asexual o adventicia:*** se forman embriones a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Método considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado el proceso productivo (Jiménez, 1998).

- c) *Multiplicación a partir de yemas preformadas:*** la propagación partir de meristemos preformados se lleva a cabo a partir de yemas axilares (nudos simples o múltiples) o meristemos apicales de los tallos, cuya multiplicación se basa en la formación de múltiples ramas que podrían individualizarse y enraizarse para formar plantas completas (George *et al.*, 2008).

En la fase de inducción, al favorecer la desdiferenciación del tejido, se puede formar una masa celular amorfa con una activa división celular llamada callo. Éste se obtiene por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales son llevados a una desdiferenciación celular, y presentan una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada. Desde el punto de vista biosintético, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, lo que significa que cada célula del cultivo mantiene la información genética completa y por tanto es capaz de producir una amplia gama de metabolitos secundarios encontrados en la planta madre (Berlin, 1988; Hurtado y Merino, 1987; Rao y Ravishankar, 2002).

* ***Etapa 3. Elongación y enraizamiento.***

Los brotes o plántulas obtenidos en la etapa anterior (etapa 2) son pequeñas, y no son capaces de crecer de una forma autosuficiente en el suelo. En esta etapa, el objetivo es lograr que los brotes crezcan y desarrollen un tallo con las primeras hojas capaces de llevar a cabo fotosíntesis, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes; lo anterior, sin un suministro artificial de carbohidratos para favorecer su aclimatización a las condiciones *ex vitro* (George *et al.*; 2008, Orellana; 1998; González *et al.*, 2012).

El enraizamiento de los brotes es una parte importante en cualquier esquema de propagación *in vitro*. Algunas especies desarrollan raíces adventicias en los brotes individualizados, pero usualmente hay varios factores que deben manejarse adecuadamente como un medio de cultivo especial, el uso de componentes o sustancias químicas (carbón activado, auxinas, reguladores osmóticos, etc.), oscuridad, entre otros (George *et al.*, 2008; Orellana, 1998).

* ***Etapa 4. Aclimatización.***

Es necesario adaptar a las plántulas de forma gradual al medio externo, una forma es disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (González *et al.*, 2012). Otro método que se puede llevar a cabo en esta etapa es la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares los cuales, podrían facilitar los cambios fisiológicos que la planta requiere con el fin de favorecer la tasa de adaptación de las plántulas a condiciones *ex vitro* (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

1. El Cultivo de Tejidos Vegetales como fuente de Metabolitos Secundarios

En términos de economía celular, es caro producir y acumular metabolitos secundarios (*ms*), pues se presentan en menores cantidades que los metabolitos primarios. Aunado a esto está el hecho de que las plantas tienen la facultad de sintetizar los metabolitos secundarios en células especializadas y almacenarlos en vacuolas en distintos estados del desarrollo, ocasionando que su extracción, aislamiento y purificación sean difíciles de lograr (Hernández, 1998).

En términos comerciales, también resulta caro producir *ms*, pues la mayoría se extraen de plantas cultivadas o silvestres y se requieren grandes volúmenes de material. A pesar de los costos que pueda tener la producción de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos, sigue siendo una opción para la producción de compuestos cuya síntesis química resulta imposible debido a la alta complejidad de las moléculas (Hernández, 1998).

El CTV presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas entre las que se destaca la producción de *ms*. Se ha revelado como una inapreciable ayuda en otros campos de la fitoquímica, principalmente en estudios biogénéticos y enzimáticos como fuente para el aislamiento de *ms* y comercialmente, para la rápida propagación de las plantas de interés (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Varios ejemplos corroboran el uso del cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios de plantas en laboratorios de investigación (**tabla 7**).

Tabla 7. Metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo *in vitro*.

Especies	Compuesto activo	Cultivo	Referencia
<i>Digitalis purpurea</i>	cardenólidos	suspensiones celulares	Hagimori <i>et al.</i> , 1982
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	altamisina	callos	Goleniowski y Trippi, 1999
<i>Panax ginseng</i>	saponinas	raíces	Choi <i>et al.</i> , 2000
<i>Hypericum perforatum</i>	hipericina	brotos	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Ruta graveolens</i>	alcaloides	brotos	Orlita <i>et al.</i> , 2008
<i>Morinda citrifolia</i>	antraquinonas, flavonoides	suspensiones celulares	Deshmukh <i>et al.</i> , 2011

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* para la producción de *ms* son (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011):

- Obtener sustancias de gran utilidad (*ms*) en condiciones controladas independientemente de factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, luz UV y temperaturas extremas).
- Obtener un aumento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos.
- Reducir los costos e incrementar la productividad mediante el control automatizado del proceso y la regulación de los procesos metabólicos.
- Contar con sistemas de producción definidos, calidad uniforme y rendimientos constantes del producto.
- Establecer sistemas estrictos de control de calidad del producto.
- Las plantas dejaran de recolectarse de poblaciones silvestres.

Sin embargo, todavía hay problemas en la producción de *ms* por cultivo de tejidos, esto se debe a la inestabilidad de las líneas celulares, rendimientos bajos, crecimiento lento y problemas en el escalado (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la producción de *ms* mediante el cultivo *in vitro* han estado centradas en la utilización de tejidos indiferenciados (callos, suspensiones celulares). Sin embargo, no todos los compuestos son producidos en células indiferenciadas en igual cantidad y calidad que los obtenidos en las plantas madres y en el caso donde se han detectado, la concentración usualmente es mucho más baja. Además, existe una inestabilidad genética y fisiológica y se observa una pérdida del producto en el tiempo. Lo anterior se debe a que muchos *ms* se sintetizan integrados a eventos de diferenciación (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

El cultivo de órganos representa una alternativa interesante para la producción de *ms*. Dos tipos de órganos son considerados de mayor importancia: los brotes y las raíces, los cuales pueden ser cultivados a gran escala. El cultivo de órganos puede producir sustancias de interés que no han sido obtenidos a partir de cultivos no diferenciados. Sin embargo, el cultivo de brotes no puede producir todos los compuestos que se obtienen en las hojas en condiciones naturales. Según Kreis (2007) si el compuesto de interés se sintetiza en las raíces, entonces no aparecerá en el cultivo de brotes. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que, aunque el compuesto se sintetice en las hojas puede que su patrón y concentración sean diferentes a los que se obtienen en plantas intactas. Como principal ventaja, se señala que el cultivo de órganos es más estable genéticamente comparado con el cultivo de suspensiones celulares y callos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

2. Cultivo *in vitro* en la familia Asteraceae

Se han realizado estudios sobre la regeneración *in vitro* de varias especies de la familia Asteraceae a partir de distintos tipos de explantes (**tabla 8**). Mediante esta herramienta, se han desarrollado protocolos para especies con valor ornamental, obtención de metabolitos secundarios en plantas medicinales y para el rescate de especies en peligro de extinción (Fay y Clemente, 1997).

Tabla 8. Especies de la familia Asteraceae en las que se ha utilizado el cultivo de tejidos vegetales.

Especie	Uso	Explante	Medio MS + RCV (mg/l)	Respuesta
<i>Chamomilla recutita</i> ¹	Medicinal	Nudos	GA ₃ (1.0-2.0) 2,4-D (0.5)	Brotes
<i>Chrysanthemum morifolium</i> ²	Ornamental	Pétalos	AIA (1-10) BA (0.01-10) K (0.1)	Embriones somáticos, Callo, Raíces, Brotes
<i>Chrysanthemum coronarium</i> ³	ornamental	Raíz, hipocótilo, hoja	BA (0.1) ANA (1)	Embriones somáticos
<i>Helianthella quinquenervis</i> ⁴	Medicinal	Tallo, hoja	BA (1), 2,4-D (0.1)	Callo
<i>Lychnophora pinaster</i> ⁵	Medicinal	Nudos	BA (0.6)	Brotes
<i>Piqueria trinervia</i> ⁶	Medicinal	Entrenudo	Kin (2.0-3.0)	Callo
<i>Gerbera jamesonii</i> ⁷	Ornamental	Ápices	BA (2), ANA (0.2)	Brotes

(Sato *et al.*, 2006¹; Tamaka *et al.*, 1998 en Teixeira da Silva, 2004²; Oka *et al.*, 1996,1999 en Teixeira da Silva, 2004³; Hernández-Altamirano, 1998⁴; de Souza *et al.*, 2007⁵; Flores-Morales, 1997⁶; Nazari *et al.*, 2014⁷)

Aunque la familia Asteraceae es una de las más conocidas, el género *Cosmos* no ha recibido extensos estudios de regeneración *in vitro*. Sin embargo, existen estudios en cuanto al cultivo *in vitro* de algunas especies de los géneros *Bidens*, *Coreopsis*, *Dahlia* y *Cosmos* que pertenecen a la misma tribu que *C. pringlei* (tabla 9).

El cultivo *in vitro* realizado en algunas especies de la tribu Coreopsidae ha tenido diversos fines como el ornamental (género *Dahlia* y algunas especies del género *Coreopsis*), para la producción y acumulación de fenilpropanoides en cultivos *in vitro* (*Coreopsis tinctoria* y *C. lanceolata*) y para el desarrollo de protocolos de transformación

genética para la obtención de *ms* (*Bidens pilosa* var. *radiata*). Otro objetivo para el uso del cultivo *in vitro*, es para la conservación de especies amenazadas (género *Cosmos*).

3. Cultivo *in vitro* en el género *Cosmos*

A pesar de que el género *Cosmos* es uno de los grupos, dentro de la familia Asteraceae, que cuenta con un gran número de especies (*ca.* 35); se han realizado pocos estudios en cuanto a la propagación convencional y solamente en *C. atrosanguineus* se han realizado estudios de regeneración *in vitro*.

El primer registro que se tiene acerca de la micropropagación de *C. atrosanguineus* fue el desarrollado en la Unidad de Micropropagación del *Royal Botanic Gardens, Kew* (RBGK). A partir de un comunicado del Dr. J. R. Howarth, se dan a conocer las condiciones de micropropagación. Explantes de entrenudos de 2 cm (provenientes de tallos de las plantas a los que se les removieron las hojas), se desinfectaron en etanol 100% durante 10 segundos; se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio (v/v) al 5% + 2 gotas de Tween 80 durante 20-25 min. Se lavaron 3 veces con agua destilada esterilizada y se sembraron en medios con un intervalo de concentraciones hormonales para encontrar las condiciones para la proliferación.

La mejor respuesta se encontró en medio MS con 2 mg/L de BA y 0.1 mg/L ANA (combinación que promovió la mayor producción de brotes en el menor tiempo). El subcultivo se llevó a cabo cada 3-4 semanas para prevenir la formación de callo y cambios morfogénéticos (como el desarrollo de 3 hojas de un entrenudo o tallos muy delgados). El enraizamiento ocurrió rápidamente en MS al 50% sin fitoreguladores produciéndose una sola raíz sin ramificaciones.

Tabla 9. Cultivo *in vitro* en especies de la tribu Coreopsidaeae.

Especie	Explante	Medio de cultivo + RCV	Respuesta regenerativa
<i>Coreopsis grandiflora</i> ¹ "Domino"	Hojas	MS líquido+54 µM ANA+44 µM BA MS+10 µM BA+14 µM GA ₃	Callo y brotes
<i>C. lanceolata</i> ²	Hojas	MS+10-20 µM BA+1 µM ANA	Brotes y raíces
<i>C. lanceolata</i> ³	Plántulas	B5+2,4-D (1 mg/L)+Kin (0.1 mg/L)	Callo y cultivos en suspensión
<i>C. lanceolata</i> ³	Raíces	MS sin RCV	Cultivo de raíces
<i>C. tinctoria</i> ³	Plántulas	MS+ANA (2 mg/L)+BA (5 mg/L)	Callo y cultivos en suspensión
<i>C. tinctoria</i> ³	Raíces	MS sin RCV	Cultivo de raíces
<i>C. tinctoria</i> ⁴	Raíces transformadas	MS sin RCV	Cultivo de raíz transformada
<i>C. tinctoria</i> ⁵	Raíces transformadas	MS sin RCV	Cultivo de raíces transformadas
<i>Cosmos atrosanguineus</i> ⁶	Yemas axilares	MS + BA (2 mg/L) y ANA (0.1 mg/L)	Brotes
<i>Cosmos atrosanguineus</i> ⁷	Nudos Tallo, hojas y peciolo con hoja	MS+0.88 µM BA MS+4.4 µM BA	Brotes Brotes
<i>Cosmos atrosanguineus</i> ⁸	Ápices y yemas axilares	MS modificado + tiamina (0.4 mg/L)+BA (1 mg/L)	Brotes
Cultivares de <i>Dahlia</i> (doble decorativa y gigante doble) ⁹	Cotiledones e hipocótilo	MS+ANA (3 mg/L)+BA (3 mg/L)	Callo y brotes
<i>Dahlia spp</i> ¹⁰	Nudos	MS+GA ₃ (1 mg/L)	Botes
<i>Bidens pilosa</i> var. <i>radiata</i> ¹¹	Hojas, hipocótilo y cotiledones	MS+BA (1 mg/L)+AIA (0.5 mg/L)	Callo y brotes

(Trader *et al.*, 2006¹; Lee *et al.*, 1994²; Reichling y Thron, 1989³; Thron *et al.*, 1989b⁴; Reichling y Thron, 1990⁵; Ortega-Larrocea *et al.*, 1997⁶; Hosoki *et al.*, 2003⁷; Kozak *et al.*, 2013⁸; Fatima *et al.*, 2007⁹; Jimenez-Mariña *et al.*, 2013¹⁰; Wang *et al.*, 2012¹¹).

De forma similar y como una contribución a los estudios realizados en México de *C. atrosanguineus*, Ortega (1996) continuó la micropropagación mediante la proliferación *in vitro* de los brotes donados por RBGK. Se utilizó el medio MS adicionado con 2 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA para la proliferación de los brotes; MS al 50% para su mantenimiento y MS al 50% + 1 mg/L de ANA para el enraizamiento. El establecimiento *ex vitro* de las plántulas, requirió de una etapa de endurecimiento y enraizamiento *in vitro* en invernadero previo al trasplante a suelo, con lo que se logró aumentar la sobrevivencia hasta un 50%. El establecimiento de las plantas en Luvisol procedente del edafocistema natural, permitió obtener una sobrevivencia del 40% y condiciones de desarrollo de las plantas similares a las obtenidas con mantillo. No se encontraron diferencias significativas debidas a la adaptación (sobrevivencia) de las plantas por la micorrización arbuscular, aunque se observó un ligero incremento en la longitud del tallo de las plantas micorrizadas, así como una más temprana inducción de la floración, la cual se dio a partir del sexto mes de crecimiento en invernadero.

Hosoki y colaboradores (2003) realizaron la micropropagación de *C. atrosanguineus* mediante el subcultivo de secciones de tallo con nudos y por división de brotes axilares. Brotes de 1 cm fueron lavados con agua corriente. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% adicionada con 0.1% de Tween 20 (v/v) por 10 min, finalizando con 2 enjuagues con agua destilada estéril en condiciones asépticas. La porción basal y las hojas se retiraron resultando 0.4 cm de explante apical.

Los explantes apicales se colocaron en medio MS basal modificado con micronutrientes y vitaminas del medio Ringe y Nitsch (1968) y 0.8% de agar, adicionado con distintas concentraciones de BA (0, 0.44, 0.88 o 4.4 μ M). Cuando los ápices alcanzaron una altura de 2-3 cm, se cortaron transversalmente y los brotes axilares se separaron. Ambos tipos de explantes se subcultivaron al mismo medio descrito anteriormente con las mismas concentraciones de RCV. En total se realizaron 4 subcultivos para comprobar la capacidad de multiplicación. El número de brotes axilares

y apicales incrementó linealmente conforme aumentaban las concentraciones de BA, obteniendo con 4.4 μM la mayor cantidad de microtallos; sin embargo, esta concentración ocasionó la vitrificación de los tejidos, por lo tanto, la mayor producción de brotes saludables se obtuvo en la concentración de 0.88 μM de BA. Para la formación de raíz, aplicaron diferentes concentraciones de IBA y el mejor porcentaje (60%) se observó con 4.9 μM .

Finalmente, Hosoki y colaboradores (2003) realizaron la regeneración de brotes a partir de entrenudos (tallos), hoja y peciolo con hoja. A los dos primeros tipos de explantes los colocaron de manera horizontal sobre el medio de cultivo, el peciolo con hoja fue parcialmente insertado. El medio utilizado para la regeneración fue el MS basal suplementado con 0, 0.19 y 1.9 μM de ANA combinado con 4.4 y 18 μM de BA. La regeneración estuvo limitada a las secciones de tallo. De 2 a 5 brotes adventicios por explante fueron obtenidos en las concentraciones de 0 y 0.19 μM de ANA combinado con las concentraciones de BA. La mayor concentración de ANA (1.9 μM) suprimió la regeneración de brotes. La hoja y el peciolo con hoja mostraron bajos porcentajes de regeneración (10%). Los brotes adventicios se presentaron en medio con 4.4 o 18 μM únicamente con BA. Las plántulas regeneradas se transfirieron a un medio libre de RCV y posteriormente al medio de enraizamiento adicionado con IBA.

Kozak y colaboradores (2013) realizaron una investigación en la cual evaluaron la capacidad de regeneración en diferentes tipos de explantes de *C. atrosanguineus*, colocándolos en diferentes orientaciones. Los brotes se establecieron a partir de ápices y yemas axilares, los cuales fueron desinfectados sumergiéndolos en una solución (v/v) de hipoclorito de sodio equivalente a 0.5% de cloro activo por 30 min, realizando finalmente 3 enjuagues con agua destilada estéril. Los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con 1 mg/L de BA (experimentos preliminares mostraron que de entre las 4 concentraciones de BA (0.2, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/L) ensayadas, la mejor concentración para la multiplicación de brotes fue con 1 mg/L). Después de varios meses de

multiplicación, ápices (2 cm de longitud) y nudos (1 cm de longitud), se disectaron y fueron usados para preparar los explantes. 7 tipos de explantes se utilizaron en el experimento: ápices con hojas, ápices sin hojas (excepto por la hoja más joven en la parte superior), ápice decapitado, ápice después de la eliminación del ápice del brote y las hojas, nudos con hojas y nudos sin hojas. Los explantes se colocaron sobre el medio en diferentes orientaciones: verticalmente con la punta del brote hacia arriba, verticalmente con la punta del brote hacia abajo y horizontalmente.

De esta forma, estos autores determinaron que el tipo de explante y su orientación sobre el medio de cultivo tienen una alta influencia sobre la regeneración y crecimiento de los brotes axilares. La eliminación del ápice a partir de ápices con hoja, mejoró la ramificación axilar. Al eliminar el desarrollo de las hojas a partir del ápice con el ápice del brote eliminado, causó una reducción en la producción de brotes axilares. El ápice sin hoja insertado verticalmente en el medio en una posición inversa, regeneró un alto número de brotes axilares, caracterizado por el mayor peso fresco. El ápice sin hoja y decapitado, colocado verticalmente con la base hacia abajo, produjo brotes axilares caracterizados por el mayor crecimiento (elongación) y el porcentaje más alto de brotes que alcanzaron una longitud de más de 1 cm.

De acuerdo a lo anterior, el CTV nos ofrece una alternativa para establecer cultivos controlados y eficientes de un gran número de especies vegetales para producir plantas completas, como un amplio ejemplo se encuentra *C. atrosanguineus*, o producir metabolitos secundarios de interés para el humano, como en los géneros *Coreopsis* y *Bidens*. Alternativa que también se puede aplicar a *C. pringlei*.

a. Características y distribución de *Cosmos pringlei* Rob. & Fern.

(1) Clasificación taxonómica y descripción botánica

Reino:	Plantae
Subreino:	Viridaeplantae
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Tribu:	Coreopsideae
Género:	<i>Cosmos</i> Cav.
Sección:	Discopoda
Especie:	<i>Cosmos pringlei</i> Rob. & Fern.

Planta herbácea perenne que alcanza entre 60 a 90 cm de altura. Tallo erecto, redondeado, escasamente ramificado. Raíces gruesas, de dos a cinco pequeños camotes o tubérculos alargados y fusiformes, de cuatro a 10 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm de grosor. Hojas pecioladas de tres a nueve cm de largo (peciolo incluido), opuestas, salen de un solo tallo y doblemente partidas con segmentos lineares, enteros. Flores en cabezuelas terminales, en ocasiones solitarias o hasta cinco por planta, de 3.5 a ocho cm de diámetro; las flores de la periferia o liguladas normalmente ocho de color rosa y lila, de 2-3.5 cm de largo y 1-1.9 cm de ancho; las flores del disco numerosas, más pequeñas de color amarillo. El fruto es un aquenio de 1.8 a 2.3 mm de largo, de forma alargada fusiforme redondeado y surcado, con la punta curvada con dos ganchos barbados; una sola semilla incluida dentro de esta estructura. Su floración ocurre en el periodo comprendido entre los meses de julio a septiembre (**figura 2**) (Olivas, 1999; Martínez, 1979; Sherff y Alexander, 1955).

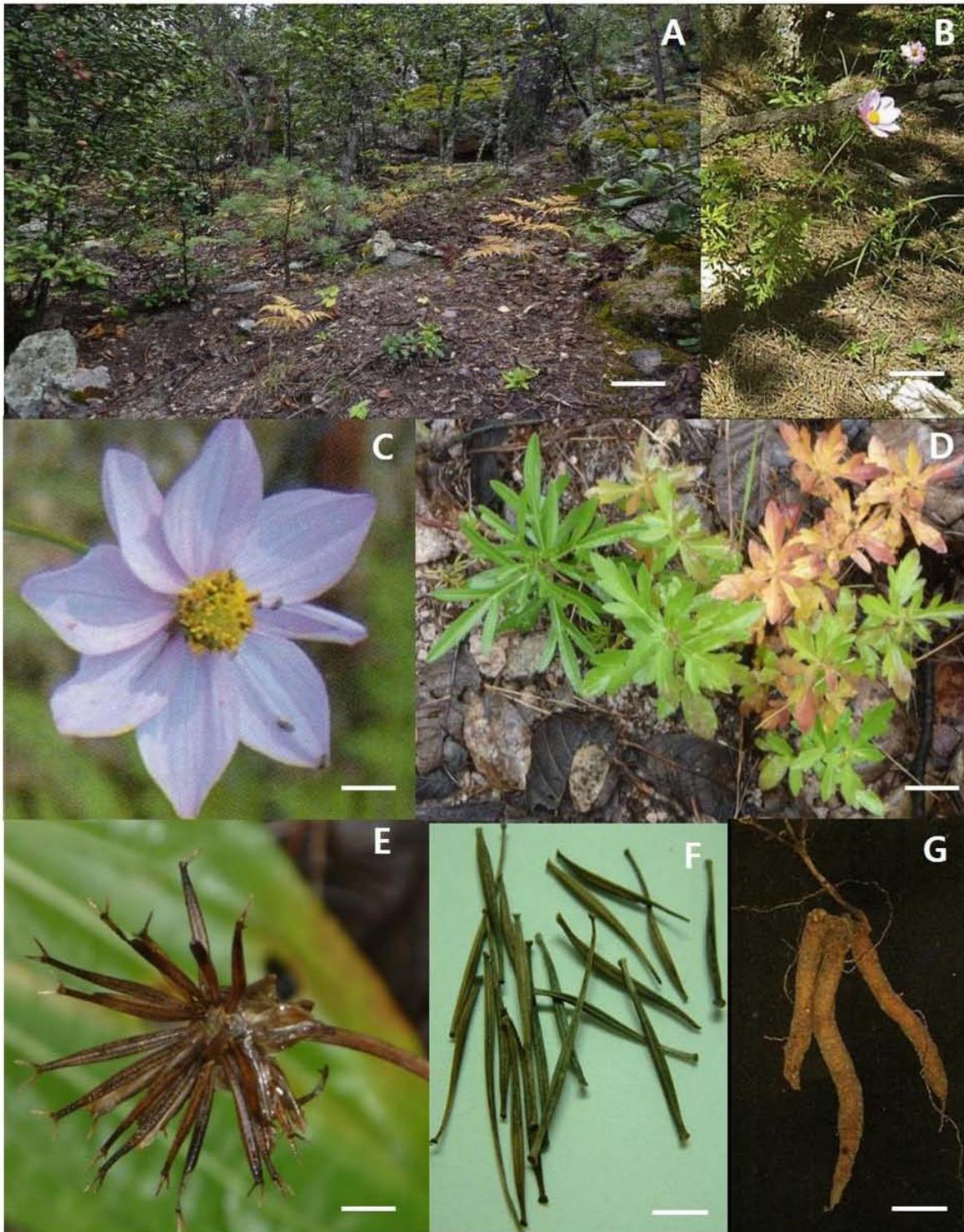


Figura 2. *Cosmos pringlei* A) Bosque de pino-encino, B) Planta completa, C) Cabezuela, D) Hojas, E) Frutos, F) Aquenios y G) Raíces tuberosas (Fotos R. Bye). Barra: 1 cm.

(2) Distribución geográfica de la especie

C. pringlei es una especie mexicana que se distribuye en bosques de pino-encino, a una altitud de 2 000-2 500 msnm, a través de la Sierra Madre Occidental desde el noroeste de Chihuahua hasta el suroeste de Nayarit (**figura 3**) (Martínez, 1979; Sherff y Alexander, 1955).

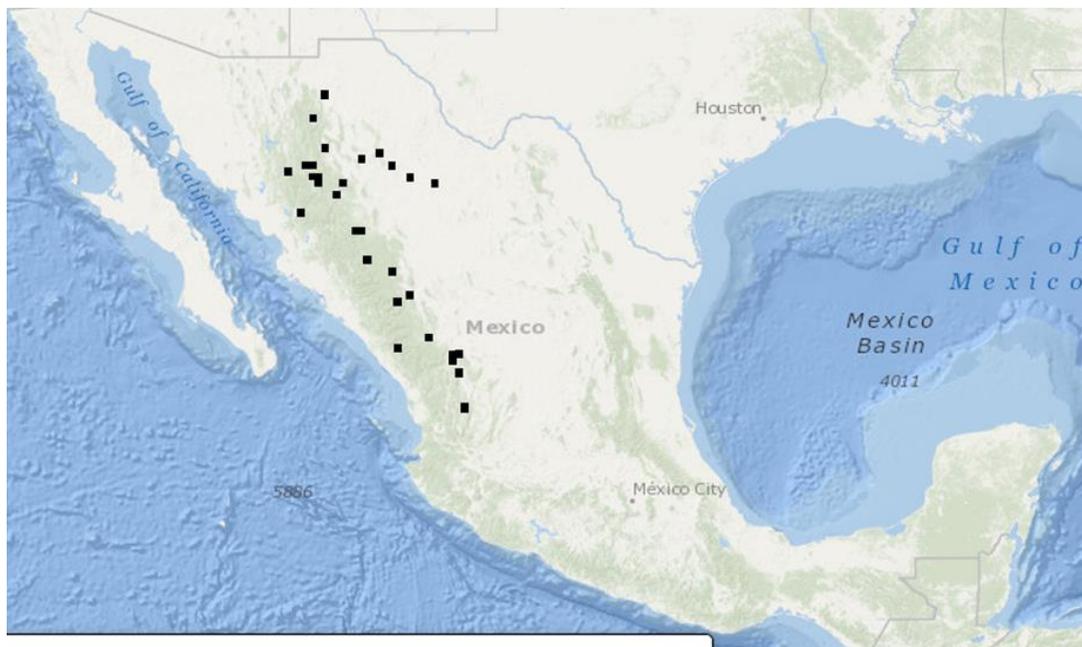


Figura 3. Distribución de *Cosmos pringlei* (<http://eol.org/pages/6235438/maps>)

(3) Usos medicinales de *C. pringlei*

Es llamada coloquialmente "Pionilla", "Bavisa" (Chihuahua) y "Ripurikí" (Rarámuri). Sus raíces son altamente valoradas con fines medicinales y se venden en los mercados locales de Chihuahua. La decocción de las raíces se toma como tisana para aliviar dolores de estómago, muelas y de cabeza, para tratar la tos, la disentería, y para mejorar la circulación. La decocción o el polvo de las raíces se aplica tópicamente para limpiar heridas (Mata *et al.*, 2002).

La población de Casas Grandes lo reporta como bueno para el tratamiento de la diarrea. En Ciudad Juárez, la utilizan para el tratamiento de trastornos gastrointestinales como empacho y diarrea, se hierven 3 raíces en 1 L de agua y se toma 2 veces al día. Los Tarahumaras emplean la decocción de la raíz para el tratamiento de la úlcera gástrica y de las hemorroides (Bye, 1996 citado en Rivero, 2000, com. per.)

(4) Estudios fitoquímicos reportados para la especie

Cuevas (1997) realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de *C. pringlei*, el cual permitió el aislamiento de los siguientes compuestos: costunólida, deshidrocostuslactona, 15-isovaleriloxi costunólida, 15-isobutiriloxi costunólida, 3 β -hidroxi-5 α -pregn-16-en-20-ona y estigmasterol (**figura 4**). La caracterización de los productos se realizó por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Rivero (2000) realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto activo, permitiendo el aislamiento de siete lactonas sesquiterpénicas (la costunólida, la deshidrocostuslactona, la 15-isovaleriloxi-costunólida, la 15-isobutiriloxi-costunólida, la 11 β -dihidrodeshidrocostuslactona, la 3 β -isobutiriloxi-deshidrocostuslactona y la 3 β -isovaleriloxi-deshidrocostuslactona), un esteroide de tipo pregnano, el 3 β -hidroxi-5 α -pregn-16-en-20-ona, y tres fenilpropanoides [el 1-(1',2'-epoxi-3'-isobutiriloxi-propano)-3-metoxi-4-isobutiriloxi-benceno, 1-(1'-isobutiriloxi-2'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiriloxi-benceno, 1-(1'-isovaleriloxi-2'-propeno)-3-metoxi-4-isobutiriloxi-benceno (**figura 4**). De éstos, cinco ya se habían descrito anteriormente en la especie. Estos productos se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

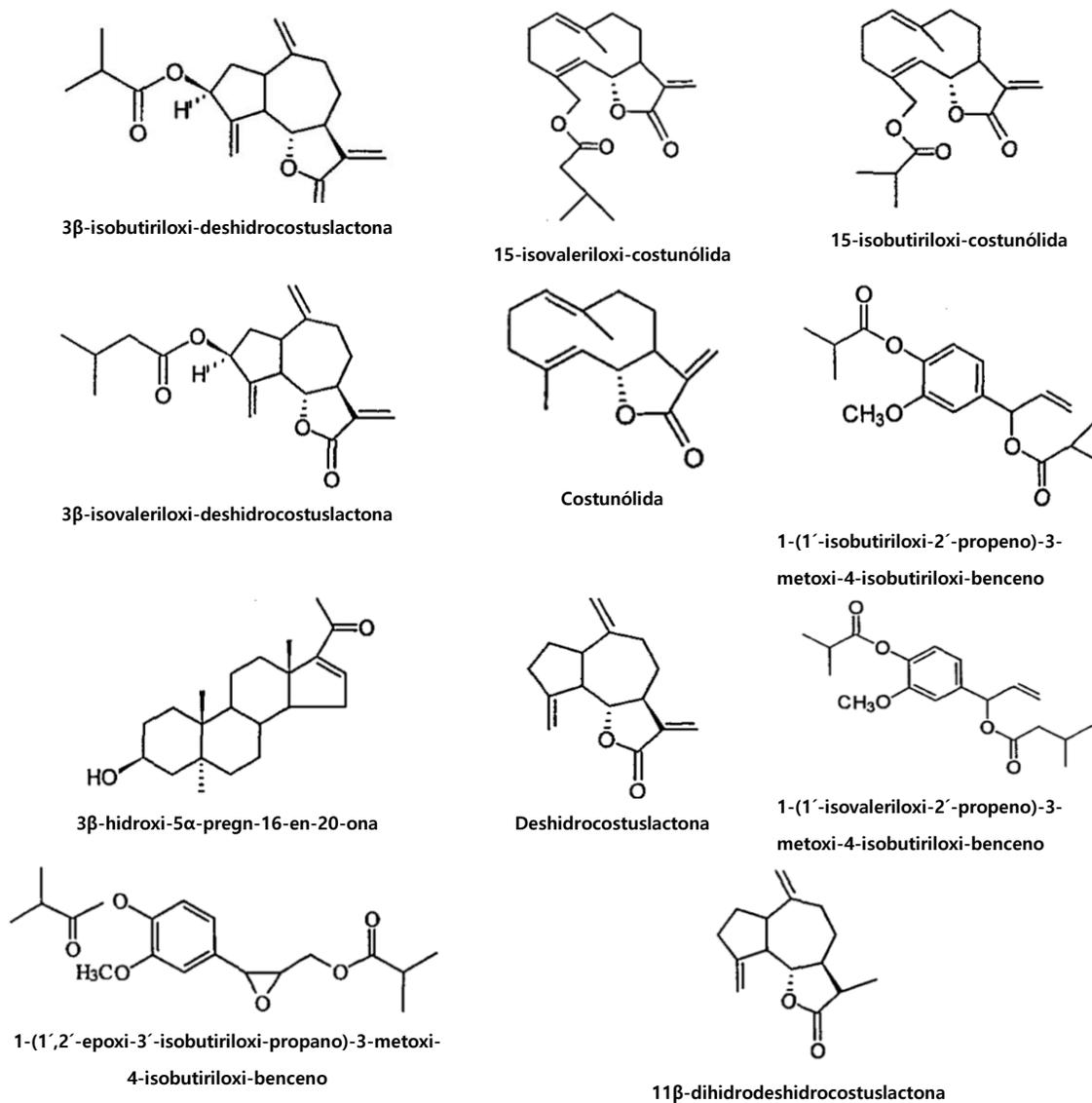


Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos aislados de *C. pringlei*.

La costunólida y la deshidrocostuslactona fueron los productos que demostraron un mayor efecto fitotóxico sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Poaceae). La primera especie fue la más sensible a los tratamientos, encontrándose que la deshidrocostuslactona provocó una inhibición del 50% del crecimiento radicular a una concentración de 101.32

µg/ml. Estos resultados han dejado la posibilidad de considerar a estos compuestos como candidatos a herbicidas pre-emergentes. Además, la deshidrocostuslactona resultó ser el inhibidor más potente de la síntesis de ATP, inhibiéndola en un 50% a una concentración de 87.1 µM. Adicionalmente, estos productos mostraron una actividad tóxica significativa contra *Artemia salina*, lo cual resultó consistente con la actividad citotóxica previamente descrita para estos compuestos. La 15-isovaleriloxi-costunólida no demostró actividad contra *A. salina*, sin embargo, provocó una moderada inhibición del crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* (CI₅₀=294 µg/ml). La actividad fitotóxica de la 15-isobutiriloxi-costunólida fue todavía menor a la 15-isovaleriloxi-costunólida, sin embargo, demostró una actividad significativa contra *A. salina*. A la costunólida, la deshidrocostuslactona (en mayor grado), 15-isobutiriloxi-costunólida y 3β-hidroxi-5α-pregn-16-en-20-ona se les puede atribuir el efecto inhibidor del crecimiento radicular demostrado por el extracto integro (Cuevas, 1997).

Referente al CTV en la especie, no se encontró registro alguno en la literatura científica.

Como se mencionó anteriormente, México es uno de los principales centros de diversificación del género *Cosmos* y en su territorio se encuentra la concentración más numerosa de todo el mundo (Rodríguez *et al.*, 2006; Ortiz-Bermúdez *et al.*, 1998), sin embargo, son pocos los estudios fitoquímicos que se han realizado en el género, limitándose a cuatro especies (*C. bipinnatus*, *C. sulphureus*, *C. caudatus* y *C. pringlei*) y únicamente se ha realizado un estudio en cuanto al cultivo *in vitro* (*C. atosanguineus*). La existencia de *C. pringlei* se encuentra en una condición crítica, siendo su conservación y estudio una prioridad, por lo que es necesario señalar que esta investigación representa el único trabajo de regeneración mediante el CTV y el único en el que se evalúa la producción de compuestos secundarios mayoritarios en cultivos *in vitro* de callo, raíz y brotes regenerados en esta especie.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel nacional se estima que la presencia de las especies pertenecientes al género *Cosmos*, han disminuido en más del 50%, posiblemente debido a la sobreexplotación de los recursos forestales, y de los ecosistemas en los cuales se desarrollan. Esto indica una posible merma en la presencia de *Cosmos* como un recurso genético vegetal (Fernández *et al.*, 1994 en Santamarina, 2006).

Tal situación ocurre con *Cosmos pringlei*, es una planta de gran importancia ecológica, etnobotánica, económica y medicinal que enfrenta una fuerte presión de recolecta debido a su aprovechamiento para tratar varios padecimientos como: trastornos gastrointestinales, para aliviar la tos y mejorar la circulación. Su uso se basa únicamente en la utilización de la raíz, lo cual conlleva a que el resto de la planta sea destruida, esto la coloca en serio peligro de extinción, aunado a la demanda para cubrir mercados nacionales, la deforestación de su hábitat, su limitada capacidad reproductiva y la falta de conocimiento sobre su propagación vegetativa y sobre la germinación de sus semillas. Por lo anterior, con la posible comprobación de sus efectos medicinales, la extracción de plantas de poblaciones silvestres terminaría por extinguir a esta especie de gran potencial biotecnológico, de ahí que es fundamental aumentar su conocimiento y contar con un sistema de propagación. De esta forma, el CTV resulta una herramienta útil, para conservar y aprovechar especies (recalcitrantes, perennes de largos ciclos, en peligro de extinción, etc.) a las cuales no se pueden aplicar otros métodos. El CTV puede auxiliar a la propagación de especies con importancia medicinal y en la obtención de compuestos biológicamente activos, así como especies que han sido sobreexplotadas o sus hábitats han sido alterados o incluso destruidos, las cuales pueden ser conservadas y ofrecidas como alternativa a la recolección en poblaciones naturales, evitando la desaparición de las mismas.

III. HIPÓTESIS

- Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones experimentales distintos cultivos *in vitro* de algunas especies de la tribu Coreopsideae expresan la capacidad morfogénica que permite la obtención de plantas completas, así como el desarrollo de callo, por lo tanto, es posible que *C. pringlei* presente una capacidad de respuesta bajo determinadas condiciones experimentales en varios tipos de explantes.
- *C. pringlei* produce de forma natural la costunólida y la deshidrocostuslactona, metabolitos secundarios que poseen actividad fitotóxica y tóxica, por lo que se espera que los cultivos de callo y plántulas regeneradas *in vitro* de esta especie tengan la capacidad de sintetizar estos metabolitos.

IV. OBJETIVOS

General

- * Establecer las condiciones experimentales para inducir la morfogénesis *in vitro* y determinar la presencia de los compuestos bioactivos, a partir de distintos tipos de explantes de *C. pringlei*.

Particulares

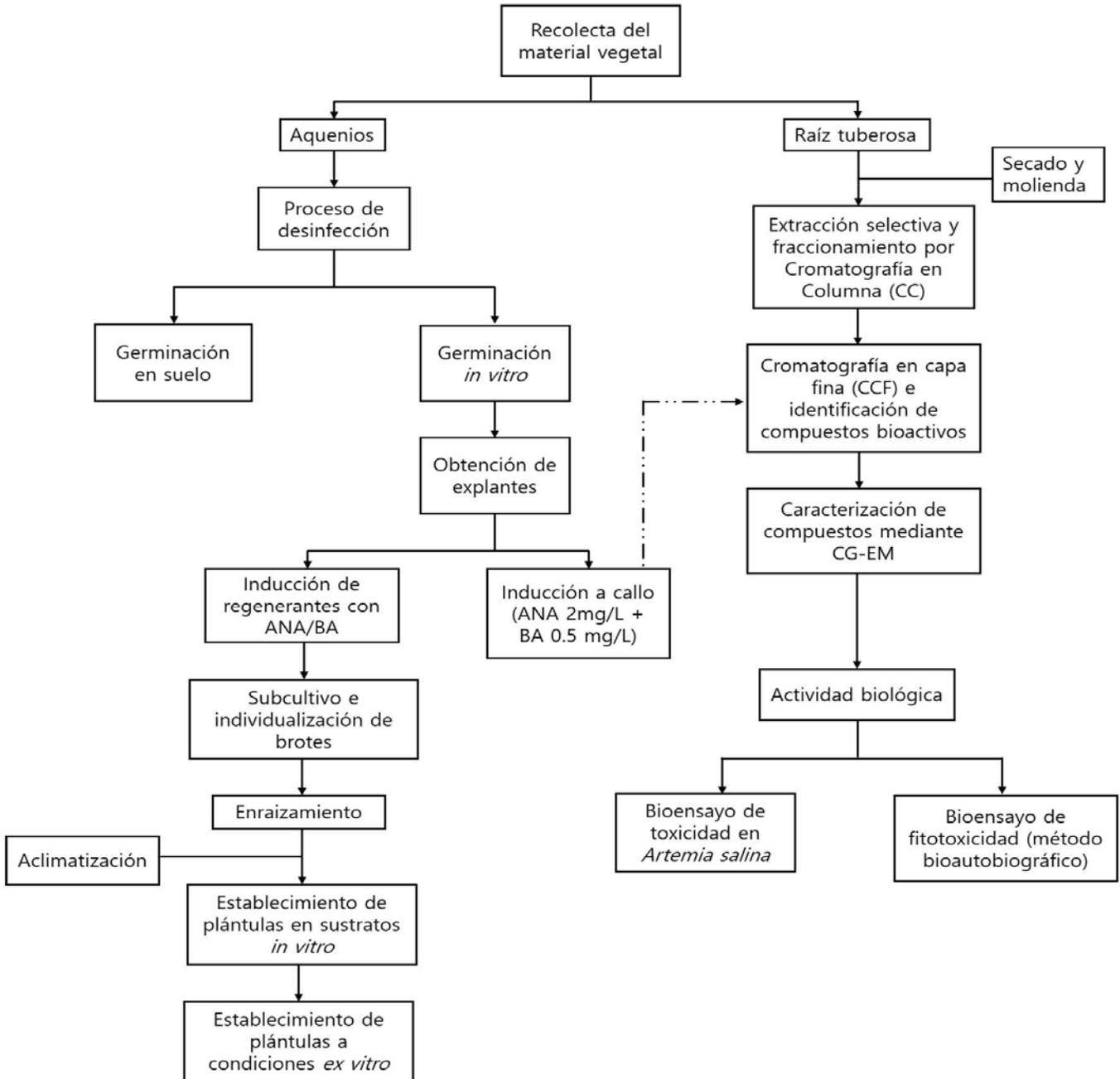
Cultivo de tejidos vegetales (CTV):

- * Determinar los procedimientos de asepsia para el establecimiento *in vitro* de los akenios.
- * Establecer las condiciones y porcentaje de germinación *in vitro* y en suelo de los akenios.
- * Evaluar la respuesta morfogénica y la obtención de callo en explantes de raíz, entrenudos, hojas, ápices y nudos, mediante el efecto de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas).
- * Establecer las condiciones para la aclimatización de las plántulas obtenidas *in vitro*.

Fitoquímicos:

- * Obtener extractos de los cultivos de callo y regenerantes, así como de las raíces silvestres de *C. pringlei*.
- * Analizar cualitativamente la presencia de la deshidrocostuslactona y la costunólida en los extractos de callo, regenerantes y raíces silvestres mediante diferentes métodos cromatográficos.
- * Evaluar la toxicidad en el modelo de *Artemia salina* L. y la fitotóxica mediante el método bioautográfico en *Amaranthus hypochondriacus* en los extractos obtenidos.

DIAGRAMA GENERAL



V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivo *in vitro*

1. Recolecta del material vegetal

Los aquenios de *Cosmos pringlei* se recolectaron en el Municipio de Guachochi en el Estado de Chihuahua, en octubre del 2012; así como las muestras del suelo en donde crece esta especie.

2. Desinfección de aquenios

Se seleccionaron 87 aquenios los cuales se sumergieron en agua destilada por 12 horas para suavizar la testa y posteriormente retirarla manualmente con pinzas.

En agitación constante, se aplicó el siguiente método de desinfección superficial: (1) solución de detergente líquido antibacterial (20% v/v) por 30 min, (2) solución de peróxido de hidrógeno (10% v/v) por 10 min, (3) solución de etanol (70% v/v) por 30 seg, (4) solución de cuprimicin (300 mg/100 mL) por 10 min, (5) solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) (30% v/v) adicionado con 2 gotas de Tween 80 por 20 min y (6) solución de PPM (Plant Preservative Mixture) (1 mL/49 mL) por 2 horas.

Se colocó un aquenio en cada frasco de vidrio de 100 mL⁻¹ de capacidad con 20 mL⁻¹ de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento.

La variable a determinar fue la contaminación (presencia de bacterias y hongos) evaluada como porcentaje a los 3, 15 y 30 días.

3. Pruebas de germinación *in vitro*

Las variables que se consideraron para estandarizar la germinación de los aquenios fue la presencia y ausencia de la testa (pericarpio) la cual se retiró utilizando pinzas de microcirugía (pinzas de relojero). Se realizó el siguiente experimento:

- Se tomaron 10 aquenios y se dividieron en 2 lotes. Se realizaron cinco repeticiones por cada lote con un aquenio por frasco el cual contenía medio de cultivo MS al 50% de sales y 3% de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.7 y se solidificó con 4 g/L de Gellan gum. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 17 min a 120°C (1.5 kg/cm²). Los frascos con los aquenios se mantuvieron en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Experimento 1. Hidratación previa por 12 h, desinfección y siembra *in vitro* del aquenio con testa.

Experimento 2. Hidratación previa por 12 h, eliminación de la testa, desinfección y siembra *in vitro* del aquenio.

La respuesta de germinación, en ambos experimentos, se evaluó a los 3, 15 y 30 días. Después de este tiempo se determinó retirar la testa para el experimento de germinación.

4. Germinación *in vitro*

Para el experimento de germinación se utilizaron 87 aquenios que se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), con las sales inorgánicas al 50% de su concentración, 30 g/L de sacarosa (MS modificado). El pH del medio se ajustó a 5.7 y se solidificó con 4 g/L de Gellan gum. El medio de cultivo se repartió en alícuotas de 20 ml en frascos de 100 ml y se esterilizó en autoclave durante 17 min a 120 °C (1.5 kg/cm²). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

La respuesta de germinación se evaluó cada 7 días durante 60 días. Se consideraron germinados aquellos aquenios que presentaban la radícula emergida y se registraron las características cualitativas de las plántulas.

5. Germinación en suelo

Se sembraron 50 aquenios en una charola germinadora con 98 cavidades redondas. El sustrato que se utilizó fue una mezcla de mantillo: tierra negra: agrolita (4:2:4) previamente esterilizada. Se sembró un aquenio por pozo y se mantuvieron en un invernadero. La respuesta de germinación se evaluó cada 7 días durante 47 días. Se registraron las características cualitativas de las plántulas.

6. Inducción de regenerantes

Los nudos y regiones apicales se cultivaron en medio de inducción MS modificado variando el tipo de gelificante y adicionado con distintas concentraciones de las citocininas BA y Kin (**tabla 10**). El tamaño de los explantes dependió de las características de los mismos, de esta forma, para las regiones apicales se tomó la yema con un nudo (2 cm de longitud) y para los nudos se tomaron secciones de 1 cm. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento con un explante por repetición, los cuales se mantuvieron en dicho medio de inducción durante 60 días, después de lo cual se colocaron en un medio basal libre de reguladores de crecimiento.

Los datos analizados para evaluar el crecimiento de los nudos y las regiones apicales fueron número de brotes por explante, número de nudos y longitud de los brotes. Además, se registró la coloración y morfología de los brotes generados.

Tabla 10. Tratamientos utilizados para la inducción de brotes a partir de nudos y regiones apicales.

Tratamiento	Gelificante (g/L)	Citocinina (mg/L)	
		BA	KIN
1	Agar (8.5)	-	-
2		0.5	-
3		2	-
4	Gellan gum (4)	-	-
5		-	0.5
6		-	2

Los explantes de hoja (1 cm²) y entrenudo (1 cm de longitud) se cultivaron en medio de inducción MS modificado adicionado con 500 mg/L de PVP y para el explante raíz (1 cm²) se utilizó el mismo medio de inducción adicionado con 1 g/L de PVP. Además, se adicionaron distintas concentraciones de auxinas (ANA) con citocininas (BA) de acuerdo a la **tabla 11**. Se realizaron 10 repeticiones por explante por cada tratamiento. Los explantes se mantuvieron en dicho medio de inducción durante 60 días, después de lo cual se colocaron en un medio basal libre de reguladores de crecimiento.

Los datos analizados para evaluar la presencia o ausencia de organogénesis fueron el porcentaje de oxidación, número de explantes con brotes, número de brotes por explante y porcentaje de callo. Se registró la coloración y la morfología de los brotes y callos generados.

Tabla 11. Tratamientos utilizados para la inducción de brotes a partir de hoja, entrenudo y raíz.

Tratamientos	(ANA mg/l)	(BA mg/l)
1	0	0
2		0.5
3		1
4		2
5	0.5	0
6		0.5
7		1
8		2
9	1	0
10		0.5
11		1
12		2

7. Segunda inducción a callo

De plántulas de *C. pringlei* germinadas *in vitro*, se cultivaron nuevos explantes de hoja (1 cm²), tallo (1 cm de longitud) y raíz (1 cm²) y se cultivaron en medio de inducción MS modificado adicionado con ANA (2 mg/L) + BA (0.5 mg/L) y 3 g/L de PVP. Los cortes para la obtención de explantes se realizaron bajo inmersión en una solución antioxidante (ácido ascórbico 150 mg/L + ácido cítrico 150 mg/L) en condiciones asépticas. Se realizaron 10 repeticiones para cada tipo de explante. El tiempo de inducción se llevó a cabo por 60 días y los datos obtenidos fueron en peso fresco y se tomaron cada 15 días.

8. Individualización y enraizamiento

Una vez concluida la etapa de inducción, los brotes obtenidos se individualizaron y se colocaron en un medio de cultivo modificado para inducir el proceso de enraizamiento. Se probaron dos tratamientos, uno control (T1) y el otro adicionado con 1 g/L de carbón activado (CA, T2). El medio de cultivo utilizado en ambos tratamientos fue el MS con sales inorgánicas al 50%, sin reguladores de crecimiento más 20 g/L de sacarosa (MS2 modificado).

Para evaluar la inducción de raíz se tomaron las siguientes variables: número de raíces y longitud de éstas. Las mediciones se realizaron cada séptimo día durante 35 días.

9. Aclimatización

Con la finalidad de obtener plántulas endurecidas y, por consiguiente, mayor porcentaje de sobrevivencia de éstas a las condiciones ambientales naturales, en la etapa de aclimatización se llevaron a cabo dos fases. En la primera fase (a) se realizó un endurecimiento de las plántulas en sustratos *in vitro* y en la segunda fase (b), se llevó a cabo el establecimiento de las plántulas a condiciones *ex vitro*. Cada fase se describe a continuación:

a) Establecimiento de las plántulas en sustratos in vitro

En esta fase, las plántulas enraizadas en la etapa anterior se sembraron en diferentes tipos de sustratos (**tabla 12**), con la finalidad de seleccionar el mejor para el establecimiento de las plántulas *ex vitro*.

Tabla 12. Sustratos utilizados para el establecimiento de plántulas *in vitro*.

Sustrato	Clave
Agrolita + MS modificado líquido sin sacarosa	AgrMS
Suelo original	So
Suelo original: agrolita (50:50)	SoAgr
Tierra de hoja: corteza pino (50:50)	Thc
MS modificado sin sacarosa	Control Ctrl

Los sustratos se colocaron en frascos de vidrio con capacidad de 100 mL, se adicionó agua destilada hasta la capacidad de saturación del suelo y se esterilizaron en autoclave por 17 min. Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento y se colocó una plántula por frasco.

Para establecer, desde la siembra *in vitro*, la asociación micorrízica arbuscular que mejore la adaptación de las plántulas a las condiciones *ex vitro*, se realizó un análisis preliminar del suelo en donde crece *C. pringlei*, con la finalidad de aislar los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) que se encuentran asociados a dicha especie. Los procedimientos y los resultados para aislar los HMA se describen en el apéndice 1.

Debido a los resultados obtenidos en el aislamiento de los HMA, se utilizó el inoculante comercial SPECTRUM® MicoBac (suspensión concentrada 1×10^{11} Unidades Formadoras de Colonias UFC/L) al 0.5% v/v (el análisis de control de calidad se muestra en el apéndice I). Cada uno de los tratamientos se dividió en dos lotes, a uno de los lotes no se le adicionó el inóculo y al otro lote se le adicionó 3 mL del inóculo por unidad experimental.

Se mantuvieron durante una semana en el cuarto de incubación y posteriormente, se transfirieron a un invernadero templado y con fotoperiodo natural por 34 días. Las variables que se consideraron fueron la sobrevivencia y el número de brotes.

b) Establecimiento de plántulas a condiciones ex vitro

Las plantas que sobrevivieron en la fase anterior, se colocaron en macetas con los sustratos en los que se presentó mayor porcentaje de sobrevivencia; además de que se probaron dos sustratos más (**tabla 13**). Cabe señalar que los sustratos Thc y mezcla se esterilizaron previamente y que, debido a la poca cantidad de plantas resultantes en la fase anterior, se realizaron 6 repeticiones para cada tipo de sustrato.

Tabla 13. Sustratos utilizados en la etapa de aclimatización.

Sustrato	Clave
Suelo original	So
Suelo original: agrolita (50:50)	SoAgr
Tierra de hoja: corteza de pino (50:50)	Thc
Suelo con inóculo	Sin
Tierra de hoja: <i>Sphagnum</i>: agrolita (40:20:40)	mezcla

Las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico que, a partir de la segunda semana, se le realizaron orificios para que la pérdida de agua fuera paulatina. Las plantas permanecieron bajo observación y adaptación durante 42 días. La variable que se consideró para cuantificar fue la sobrevivencia.

10. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias significativas en la respuesta de los distintos tejidos a los distintos tratamientos, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y se aplicó una prueba de Duncan para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre tratamientos.

El análisis se realizó con la ayuda del paquete estadístico STATISTICA 10.

B. Análisis fitoquímico

1. Análisis químico

a. Secado del material vegetal

Las raíces tuberosas utilizadas en el presente estudio, se recolectaron en el Municipio de Guachochi en el Estado de Chihuahua, en octubre del 2012. La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, Instituto de Biología UNAM). El material vegetal obtenido, mediante el cultivo *in vitro*, para la realización del estudio fitoquímico, se muestra en la siguiente **tabla 14**:

Tabla 14. Cultivos *in vitro* utilizados para el análisis fitoquímico.

Clave	<i>Cosmos pringlei</i>
Rpa	Partes aéreas (<i>in vitro</i>)
Rr	Raíces (<i>in vitro</i>)
Ch	Callos de hoja (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)
Ct	Callos de tallo (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)
Cr	Callos de raíz (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)

El proceso de secado se realizó de dos maneras. Las raíces recolectadas en el campo (2 kg), se dejaron secar a temperatura ambiente y el material vegetal obtenido *in vitro* se secó por liofilización (liofilizadora marca Heto FD3); posteriormente se realizó la molienda y se procedió a la obtención de los extractos orgánicos.

b. Método de extracción y fraccionamiento

Al material vegetal seco (**tabla 14**), se le realizó la extracción en frío mediante un proceso de maceración empleando una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH (1:1) durante 7 días,

posteriormente se filtró y se destiló a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor (Büchi R-114). La destilación se llevó a cabo por tres semanas. El extracto obtenido fue transvasado a un recipiente previamente pesado para eliminar por completo el disolvente, con el fin de calcular los porcentajes de rendimiento.

La cromatografía en columna (CC) se realizó únicamente para el extracto de las raíces provenientes de campo, con la finalidad de obtener los compuestos (lactonas sesquiterpénicas) biológicamente activos y utilizarlos como estándares en la comparación de los extractos provenientes del material vegetal *in vitro*.

El extracto total de raíz (312.51 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna utilizando 4.0 kg de gel de sílice Merck 60 (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla de 70-230 μm ASTM) como fase estacionaria y se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de Hex, AcOEt y MeOH (**tabla 15**). Se colectaron alícuotas de 1 L y cada una se concentró bajo presión reducida en un rotavapor a una temperatura de 60 °C. Cada alícuota se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) y reunieron las que presentaron similitud.

c. Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina (ccf)

Los extractos obtenidos se analizaron por CCF utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (Sílica gel 60 F254 Merck) con un espesor de 0.25 mm. Como sistema de elución se utilizaron diversas mezclas compuestas de Hex, CH_2Cl_2 y MeOH en diversas proporciones. Las placas se observaron en un gabinete con luz ultravioleta (UV), tanto en longitud de onda larga (365 nm) y longitud de onda corta (254 nm). Posteriormente, se revelaron con sulfato cérico (revelador general para productos orgánicos). En la **tabla 16** se muestran los estándares que se utilizaron para detectar su presencia o ausencia en los extractos provenientes de cultivos *in vitro*.

Tabla 15. Eluyentes utilizados en la cromatografía en columna del extracto de raíz (CH₂Cl₂:MeOH)

Mezcla de eluyentes
Hex 100%
Hex: AcOEt (90:10)
Hex: AcOEt (80:20)
Hex: AcOEt (70:30)
Hex: AcOEt (60:40)
Hex: AcOEt (50:50)
Hex: AcOEt (40:60)
Hex: AcOEt (30:70)
Hex: AcOEt (20:80)
Hex: AcOEt (10:90)
AcOEt 100%
AcOEt: MeOH (80:20)
AcOEt: MeOH (40:60)
MeOH 100%

Tabla 16. Referencias utilizadas para la detección de lactonas sesquiterpénicas en CCF

Referencia
Costunólida
Deshidrocostuslactona
15- isovaleriloxi costunólida
15-isovaleriloxi costunólida + 15-isobutiriloxi costunólida

d. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Para caracterizar los componentes presentes en las muestras seleccionadas (Regenerantes de partes aéreas, deshidrocostuslactona y callo a partir de raíz) se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technology® 6890N) equipado con un detector de masas (LECO-TOF). Todos los análisis se realizaron en una columna capilar DB-5 0.18 μm (Supelco®) [0.18 mm x 10 m] utilizando un gradiente de temperatura desde 40 hasta 340 °C (4 °C/min; 40 minutos). El helio se utilizó como gas acarreador (1 mL/min). La identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizó mediante la comparación con la base de datos (NIST, mayo 2014) y con los estándares disponibles.

2. Actividad biológica

a. Bioensayo de toxicidad con *Artemia salina* L.

Eclosión de las larvas de *Artemia salina* L. Los huevecillos del crustáceo *A. salina* se incubaron durante 48 horas en salmuera, previamente oxigenada durante 30 min. Al término de este tiempo, los crustáceos se encontraron disponibles para realizar el bioensayo.

Preparación de las muestras. Se realizó en frascos viales de 5 mL. Las muestras (regenerantes de partes aéreas, extracto crudo de raíz tuberosa y deshidrocostuslactona) fueron preparadas disolviendo 5 mg de la sustancia de prueba (extracto o fracción) en 5 mL del disolvente apropiado. De la disolución anterior se transfirieron 5, 50 y 500 $\mu\text{g/mL}$ a cada vial y por triplicado, se dejó evaporar el disolvente hasta sequedad a temperatura ambiente.

Bioensayo. Cada vial se aforó con 5 mL de salmuera y se transfirieron 10 nauplios del crustáceo a cada uno de los viales. De esta manera se obtuvieron concentraciones finales

de 1 000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes. Para que un extracto o fracción se considere activo la CI_{50} debe ser menor a 1 000 $\mu\text{g/mL}$ y en el caso de un compuesto puro, la CI_{50} debe ser menor a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Anderson *et al.*, 1991).

Preparación de las muestras control. (1) Control positivo: deshidrocostuslactona. Compuesto mayoritario en la raíz de *C. pringlei*. Se ensayaron las mismas concentraciones descritas anteriormente. (2) Control negativo: CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH. El mismo procedimiento descrito en el bioensayo se utilizó para los controles negativos que contenían únicamente el disolvente empleado para la preparación de las muestras de prueba.

b. Bioensayo de fitotoxicidad mediante el método bioautográfico.

La valoración de la actividad fitoinhibidora de los extractos y compuestos puros se realizó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae).

La determinación de la actividad fitotóxica mediante el método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 20 x 5 cm recubiertas con gel de sílice. En cada placa se adsorbieron cada una de las muestras; posteriormente se efectuó la elución con una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH (99:1). Al término del proceso de elución se evaporó el disolvente y las cromatoplasas se cubrieron con una suspensión de agar al 1%.

Se realizaron dos réplicas en todos los casos. Paralelamente dos placas con muestra problema (control de disolvente) se eluyeron en el mismo sistema; mientras que otras dos placas también sin muestra (control blanco; es decir únicamente agar), se dejaron eluir.

Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrió completamente con las semillas de *A. hypochondriacus*. Las placas con semillas se incubaron a 28 °C durante dos días en una atmósfera húmeda y se observaron cada 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la zona de inhibición y se comparó con una placa de cada una de las muestras (deshidrocostuslactona, extracto orgánico y extracto de partes aéreas), eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno sulfato cérico.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Cultivo *in vitro*

1. Material biológico

Cuando las plantas son propagadas con propósitos de conservación es importante mantener la diversidad genética, por lo que es conveniente iniciar los cultivos a partir de semillas (Fay y Gratton, 1992).

Los nombres dados a las semillas en la familia Asteraceae son variables e incluyen, indiscriminadamente, los términos aquenio y cipsela (Marzinek *et al.*, 2008). La cipsela ha sido considerada como el nombre para el fruto de la familia que difiere del aquenio por una capa adicional (perianto) sobre el pericarpio debido a la posición inferior del ovario; sin embargo, muchos botánicos siguen utilizando el término aquenio (Spjut, 1994). Barroso y colaboradores (1999) y Judd y colaboradores. (2002) han adoptado el término aquenio para Asteraceae. Marzinek y colaboradores (2008) adoptaron el término cipsela, y Spjut (1994) empleó aquenio y cipsela para las especies de Asteraceae. En esta investigación nos referiremos a las semillas como aquenios.

En el Municipio de Guachochi, estado de Chihuahua, se recolectaron 173 aquenios de los cuales se tomaron 137 para llevar a cabo esta investigación. Cabe destacar que se recolectaron 11 lotes y cada uno de éstos contó con un número de aquenios distinto. En general, los aquenios no presentaron daño en cuanto a su fisonomía; únicamente tres no presentaron semillas al retirar la testa. Lo anterior se llevó a cabo en octubre del 2012.

2. Evaluación de la eliminación del pericarpio sobre la germinación *in vitro*

Primack (1987) indicó que la pared del fruto puede determinar varios aspectos de la germinación de la semilla, la cual puede seguir siendo una capa protectora dura en cariósides y aquenios. En el caso de *C. pringlei*, lo anterior sucede con el pericarpio del aquenio.

Tomando en cuenta la característica del pericarpio (coriáceo y seco) en la familia Asteraceae, a la cual pertenece *C. pringlei*, se realizó una prueba para comparar la respuesta de germinación. El experimento consistió en retirar la cobertura externa (pericarpio) de forma manual con la ayuda de pinzas de tipo relojero (**figura 5**).

Los experimentos presentaron diferencias en los porcentajes de germinación. En el experimento 1 (con testa), ninguno de los aquenios presentó germinación en los dos tiempos establecidos (3 y 15 días), posteriormente se retiró la cobertura externa y comenzaron a germinar de manera sincrónica a partir del tercer día. En el experimento 2 (sin testa) los aquenios presentaron una germinación del 80% al 3 día y al cabo de los 15 días se presentó el 100% de germinación (**tabla 17**).



Figura 5. Aquenio de *C. pringlei*. A) aquenio con pericarpio. B) aquenio sin pericarp (flecha negra) en donde se observa la semilla con la cubierta seminal (flecha blanca). Barra 0.5 cm

Tabla 17. Porcentaje de germinación de los aquenios con pericarpio y sin pericarpio.

Experimento	Total de aquenios	% de germinación	
		3 días	15 días
1 Con pericarpio	5	0	0
2 Sin pericarpio	5	80	100

Nuestros resultados son similares con lo reportado por Hernández (1998) en semillas de *Helianthella quinquenervis*, la germinación de las semillas con testa en MS sólido no alcanzaba el 15%, lo que representó una baja respuesta comparado con el 100% de las semillas sin testa.

En este estudio se demostró que los aquenios de *C. pringlei* presentaron latencia causada por el pericarpio. La presencia de la pared del fruto alrededor de las semillas de *Raphanus raphanistrum* ejercen una restricción física en la imbibición y en la reducción de la germinación (Cousens *et al.*, 2010). Las semillas, dentro del fruto, absorbían agua, pero no la suficiente como lo hicieron las semillas sin la cobertura del fruto. Tanto la cubierta de la semilla como la del fruto presentaron un efecto inhibitorio en la germinación, las semillas, sin el pericarpio, no presentaron altos porcentajes de germinación a no ser que se dañe la cubierta de la semilla (Baskin y Baskin, 2014).

Souza (2014) también atribuye al pericarpio el retraso en la germinación de la semilla. En algunas especies, los aquenios presentan una resistencia mecánica contra la germinación, esta característica se observó en algunas especies heterocárpicas, en las que hay una variación en el espesor y en la constitución de los aquenios, mientras que en otras se le atribuye a la presencia de inhibidores químicos.

Tiwari y colaboradores (2016) colocan al género *Cosmos* como plantas que contienen semillas con dormancia endógena fisiológica no profunda. Las semillas con dormancia endógena no germinan debido a factores asociados con el embrión; sin

embargo, al retirar la cobertura externa de la semilla (el pericarpio) a menudo permite que el embrión germine, esto es que el mecanismo de inhibición fisiológica que presenta el embrión previene la emergencia de la radícula. Además, un bajo potencial de crecimiento, o la potencia de empuje del embrión juegan un papel importante en el retraso de la germinación. En consecuencia, las estructuras que cubren el embrión, incluyendo el endospermo (o perisperma), cubiertas de las semillas, las paredes del fruto indehiscente, brácteas, bracteolas y perianto, pueden restringir la emergencia de la radícula, especialmente en semillas recién maduras (Baskin y Baskin, 2014).

Lo anterior indica que la eliminación mecánica del pericarpio, facilita la imbibición y los procesos metabólicos subsecuentes que dan lugar a la germinación; de esta forma, a fin de acelerar el proceso de germinación, a los aquenios utilizados en los siguientes experimentos se eliminó el pericarpio.

3. Establecimiento aséptico de los aquenios

Una ventaja de iniciar los cultivos a partir de semillas es que pueden resistir una severa desinfección superficial y germinar para producir plántulas libres de contaminantes, mismas que pueden ser utilizadas como fuente de explantes (George y Sherrington, 1984).

En el método de desinfección empleado en esta investigación, se utilizaron diferentes compuestos para obtener material aséptico y así evitar su pérdida por contaminación. Los compuestos utilizados fueron: jabón líquido, peróxido de hidrógeno, etanol, cuprimicin (fungicida), hipoclorito de sodio, Tween 80 y PPM (Plant Preservative Mixture), los aquenios (sin el pericarpio) se sometieron a estas sustancias variando su concentración y tiempo de exposición (ver página 52).

Los resultados arrojaron que el 19.54% de los achenios desarrollaron contaminación por hongos y bacterias, organismos contaminantes más frecuentes que se observan en los cultivos. Estos organismos se encuentran en todas las plantas y semillas, principalmente en aquellas que se colectan en el campo (Alvarado, 1998) y que, de acuerdo a Digonzelli y colaboradores (2005), producen cuantiosas pérdidas de material vegetal tanto en la micropropagación comercial como en los trabajos de investigación.

Esta contaminación fue de manera localizada sobre cada uno de los achenios; es decir, al retirar el pericarpio, se observó una capa delgada que cubría a la semilla denominada cubierta seminal (**figura 5, flecha blanca**) que una vez que la raíz comenzó a emerger, provocó la ruptura de esta cubierta originando el desarrollo de los microorganismos determinando que se trataba de contaminación sistémica.

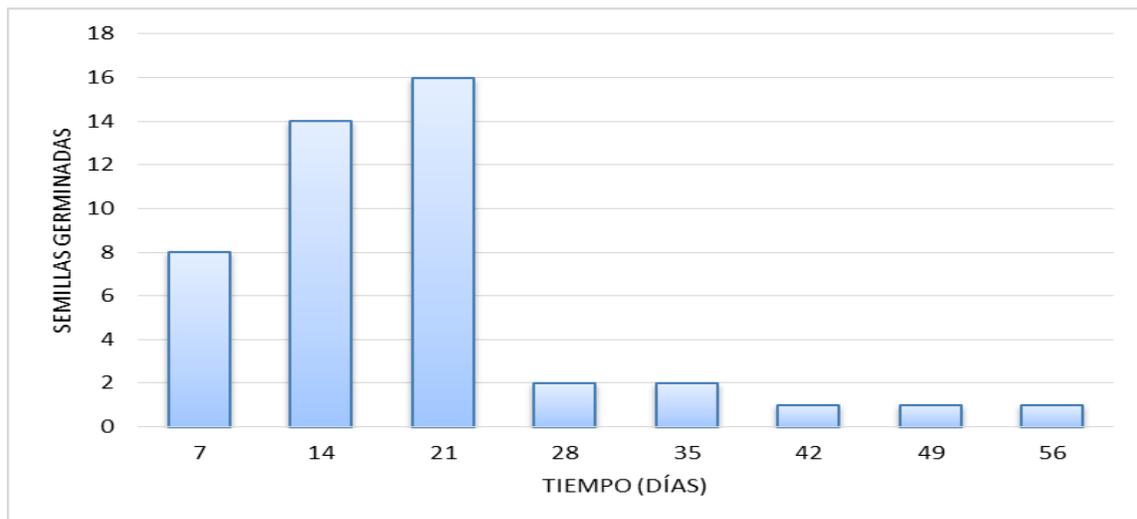
Las superficies exteriores de algunas semillas están profundamente picadas, estriadas o cubiertas por vellosidades y pueden tener adheridos restos del fruto el cual puede albergar organismos contaminantes (particularmente en semillas secas o semillas cosechadas del suelo). En general, el interior de las semillas está naturalmente aséptica a menos que haya una infección sistémica, o que la semilla esté perforada por algún insecto durante el estadio temprano del desarrollo de la semilla (Bunn y Tan, 2002).

Uno de los efectos de los microorganismos sobre las plantas *in vitro* puede ser que compiten con ellas por los nutrientes del medio de cultivo, además les provocan daños directos e indirectos al colonizar sus tejidos o al secretar metabolitos tóxicos en el medio de cultivo, ocasionando la disminución o inhibición de la germinación, multiplicación o enraizamiento y con frecuencia la muerte de la planta o tejido (Leifert *et. al.*, 1994; Alvarado, 1998).

4. Germinación *in vitro*

Flores (2004) define a la germinación como la sucesión secuenciada de eventos morfogénicos, tales como imbibición del agua, actividad enzimática, iniciación del crecimiento del embrión, ruptura de la cubierta de la semilla y la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula; que resultan en la modificación de un embrión en una plántula; pero este último evento, la emergencia de la raíz, es el signo visible de que la germinación ha terminado. Con base en este último criterio, se consideraron germinados los aquenios de *C. pringlei* que presentaron la radícula emergida.

El porcentaje de germinación fue de 51.72%, 45 aquenios de un total de 87 sembrados. La germinación fue asincrónica. A los 7 días de iniciar los cultivos, se observaron los primeros 8 aquenios con la radícula emergida; a los 14 días de incubación se observaron 14 aquenios más que germinaron. En la siguiente semana, a los 21 días, germinaron 16, esta última fue la máxima cantidad de germinación ya que, en las semanas posteriores, la germinación fue de 1 a 2 aquenios por semana (**gráfica 1**).



Gráfica 1. Número de aquenios germinados cada 7 días por 56 días.

Es importante mencionar que son pocos los reportes de germinación *in vitro* en el género *Cosmos*, uno de ellos realizado por Santiago-Cruz y colaboradores (2014) en *C. bipinnatus*. Esta investigación representa el primer reporte de germinación *in vitro* de *C. pringlei*. Por otro lado, existen reportes de la germinación *in vitro* de varias especies de la familia Asteraceae; por ejemplo, Fatima y colaboradores (2007) reportaron la germinación de dos cultivares exóticos de *Dahlia*, la decorativa doble y la gigante doble, con el 82% y 91% de germinación, respectivamente, a las 3 semanas de cultivo sobre medio MS basal. En *Artemisia vulgaris*, Govindaraj y colaboradores (2007) reportaron la germinación en medio MS basal del 95% de las semillas después de 5-7 días expuestas en oscuridad. Para *Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink, la germinación se presentó después de los 7 a 8 días de cultivo en medio MS basal (Nazari *et al.*, 2014). Santiago-Cruz y colaboradores (2014) reportaron la germinación del 81-95% de las semillas escarificadas mecánicamente de *C. bipinnatus* sobre medio MS modificado con distintas concentraciones de cromo Cr(VI); sin embargo, la concentración más alta de este metal pesado (2.0 mM) presentó un bajo porcentaje de germinación (40%), lo anterior después de 7 días de cultivo.

Los porcentajes de germinación arriba mencionados difieren en cuanto a los datos obtenidos de germinación en la presente investigación para *C. pringlei*, lo anterior se puede deber a que tres de las especies son cultivadas, dos (*Dahlia* y *Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink) como plantas ornamentales y *Artemisia vulgaris* como planta medicinal; en el caso de *C. bipinnatus* y *C. pringlei*, las semillas obtenidas fueron recolectadas directamente de su ambiente natural, necesitando ambas especies escarificación mecánica para germinar. Por otro lado, se presentaron similitudes entre estas especies de Asteráceas: 1) el tiempo de germinación de casi todas las semillas comenzó a partir del séptimo día de cultivo, excepto los dos cultivares de *Dahlia* que comenzaron a la tercera semana y 2) el medio de cultivo utilizado en todas las especies fue el MS.

Sin embargo, a pesar de haber retirado el pericarpio del achenio, no presentaron germinación cerca del 50% de éstas (42 de los 87 achenios sembrados *in vitro*). Una semilla puede permanecer viable o viva pero incapaz de germinar o crecer por varias razones. Éstas pueden ser por condiciones internas o externas. Una situación interna puede ser que el embrión no ha alcanzado la madurez morfológica para germinar. La germinación de semillas de plantas silvestres a menudo está limitada internamente de una u otra forma, pero las semillas de muchas plantas domesticadas están limitadas únicamente por la falta de humedad y/o falta de calor. A partir de estas dos situaciones se puede diferenciar la *quiescencia* que es el estado de una semilla cuando su incapacidad para germinar solo se debe a que no se dan las condiciones externas adecuadas y la *latencia* que es el estado de una semilla cuando su incapacidad para germinar se debe a condiciones internas, aunque las condiciones externas sean las adecuadas (Salisbury y Ross, 1992).

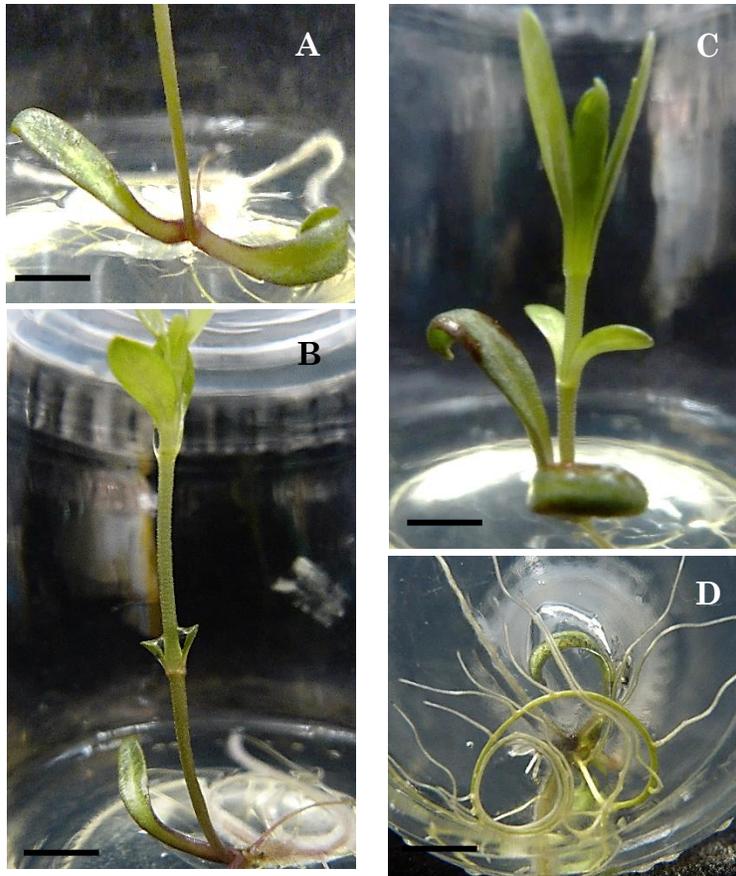


Figura 6. Crecimiento de las plántulas de *Cosmos pringlei*.

Barra: 1 cm

El crecimiento de las plántulas, en general, fue rápido, pero de manera asincrónica. Los cotiledones se observaron largos (de 2 a 3 cm) y en la mayoría de los casos comenzaron a tornarse rojizos desde la base hacia la parte media del cotiledón (**figura 6A**). A los 21 días de la germinación, los cotiledones comenzaron a oxidarse por completo. En todas las plántulas, el tallo se observó alargado y delgado, con un color verde más claro que las hojas (**figura 6B**), a los 35 días la mayoría de los

tallos se tornaron de color rojizo. Al cabo de los 40 días alcanzaron una longitud aproximada de 10 cm. Las hojas siempre permanecieron verdes. Las primeras dos hojas verdaderas eran de talla pequeña (**figura 6C**). En cuanto a las raíces, a los 14 días de germinación, se observaron alargadas con un eje principal de color verde y la presencia de pelos radiculares; las raíces secundarias, en algunos casos, presentaban raíces terciarias, ambas de color blanco. En ninguna de las plántulas se observó el desarrollo de raíces tuberosas característica de esta especie (**figura 6D**).

5. Germinación en suelo

Los aquenios que se sembraron en la mezcla de suelo (pag. 54) tardaron aproximadamente el doble de tiempo en germinar en comparación con los aquenios cultivados *in vitro*; es decir, 2 aquenios germinaron a los 14 días de siembra y 8 aquenios germinaron a los 7 días de iniciar los cultivos, respectivamente.

El porcentaje de germinación también fue diferente entre ambos métodos (*in vitro* y en suelo). En este último se obtuvo el 48% de germinación a los 47 días, es decir, germinaron 24 aquenios de los 50 sembrados en la mezcla de suelos.

De igual forma que las plántulas obtenidas *in vitro*, el desarrollo de las plántulas, en suelo fue rápido y de manera asincrónica, el tallo se observó delgado, alargado y con un color verde claro. Las primeras dos hojas verdaderas también fueron de talla pequeña y las raíces se observaron blancas, alargadas y con pelos radiculares. En los cotiledones y tallos no se presentó la coloración rojiza que se observó en las plántulas germinadas *in vitro*.

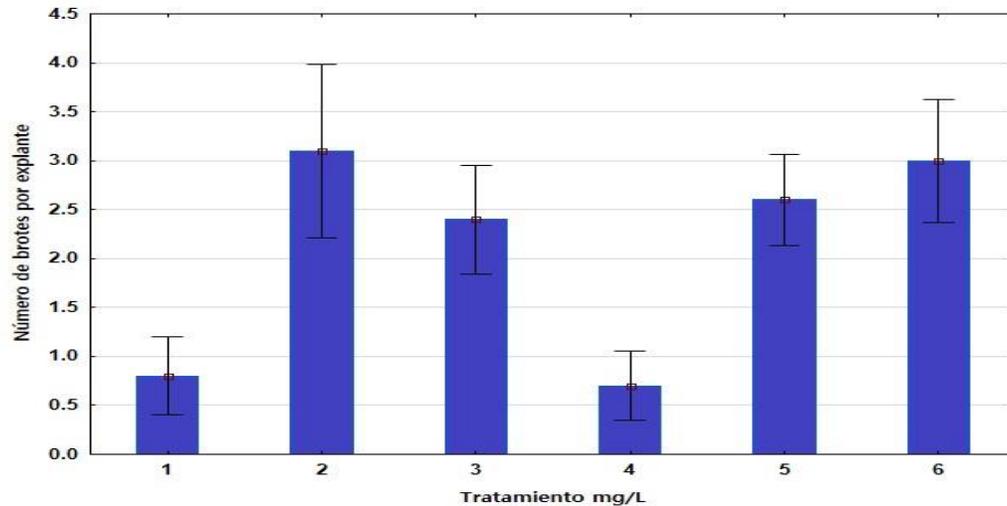
6. Evaluación del efecto de las citocininas sobre el crecimiento de regiones apicales.

El 73.3% de las regiones apicales formaron brotes. Al realizar el análisis de la cantidad de brotes, los cuales comenzaron a aparecer a los 20 días de la siembra en medio de inducción, se determinó que esta respuesta se promovió mediante la activación de yemas preformadas. A los 60 días de cultivo, se encontraron diferencias significativas en los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/L) y 6 (Kin 2.0 mg/L) comparados con los tratamientos control T1 y T4 (**tabla 18**), lo anterior indica que la presencia y/o las altas concentraciones de las citocininas inducen la proliferación y activación de las yemas axilares, a través de

la disminución de la dominancia apical (Boeri, 2015) y por lo tanto su presencia indujo la formación de una mayor cantidad de brotes (**gráfica 2, figura 7B y C**).

Es importante hacer notar que en este tipo de explante, no se observó un patrón claro en cuanto a la concentración y afinidad por una citocinina (BA o Kin) para la formación de brotes, las medias en los tratamientos fueron muy similares para cada grupo estadístico y que el porcentaje de explantes que formaron brotes fue idéntico en todos los tratamientos excepto en los controles (**tabla 18**). Lo anterior puede deberse a la interacción que ejercen las fitohormonas con las citocininas aplicadas exógenamente, ya que algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de fitohormonas (Jiménez, 1998).

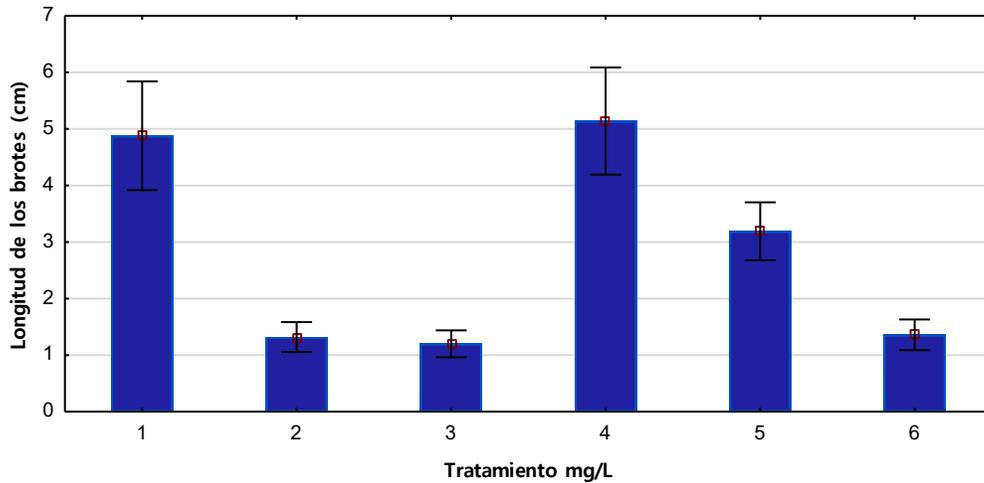
Estudios en ápices de *Aristolochia tagala* realizados por Rajanna y Sharma (2015), arrojaron que las zonas apicales cultivadas en medio MS sin RCV no mostraron signos de brotación a las 8 semanas de incubación. Sin embargo, al utilizar dos tipos de citocininas (BA y kinetina), demostraron que la primera a concentraciones de 1 y 4 mg/L, resultaron ser las mejores en cuanto a la inducción de un solo brote y la inducción de brotación múltiple, respectivamente. En presencia de citocininas, los ápices mostraron respuesta en el crecimiento. Así mismo, resultados similares se obtuvieron en *Cosmos atrosanguineus*, en donde Hosoki y colaboradores (2003), al utilizar explantes apicales, observaron que el número de brotes axilares aumentó linealmente conforme aumentaban las concentraciones de BA, obteniendo con 1.0 mg/L la mayor cantidad de microtallos; sin embargo, esta concentración ocasionó la hiperhidratación de los tejidos. La mayor producción de brotes saludables se obtuvo en la concentración de 0.2 mg/L de BA.



Gráfica 2. Promedio del número de brotes por explante obtenidos de las regiones apicales de *C. pringlei*. Respuesta a los 60 días de inducción.

Como se mencionó anteriormente, los controles T1 (**figura 7A**) y T4, formaron la menor cantidad de brotes con 0.80 ± 0.44 y 0.70 ± 0.39 respectivamente (**tabla 18**); sin embargo, fueron los que presentaron mayor crecimiento con 4.88 ± 1.06 cm en el T1 y 5.14 ± 1.05 cm en el T4 (**gráfica 3**), lo anterior indica que ambas citocininas, tanto la benciladenina (BA) como la kinetina (Kin), y en cualquiera de sus concentraciones, ejercieron una actividad inhibitoria en el crecimiento en longitud de los brotes, pues disminuyó la dominancia apical y la producción y actividad de las auxinas que promueven el crecimiento del eje principal (Hutchinson y Kieber, 2002; Kakimoto, 2003). Al estar ausente la aplicación externa de citocininas en los tratamientos control, 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).

Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos por Rajanna y Shilaja (2015) con *Aristolochia tagala* en donde observaron que el incremento en la concentración de BA y Kin aumento el número de brotes por explante y disminuyo la longitud de los mismos.



Gráfica 3. Promedios de crecimiento de las regiones apicales de *C. pringlei*. Datos obtenidos a los 60 días de inducción.

A los 60 días de inducción, el promedio de los nudos, de acuerdo a los análisis estadísticos ($p \leq 0.05$), no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (**tabla 18**); aunque sí se observaron diferencias numéricas importantes en los tratamientos con kinetina los cuales presentaron los valores más altos siendo el T5 (Kin 0.5 mg/L) el que promovió el mayor número de nudos (11.90), seguido del T6 (Kin 2.0 mg/L) en donde se desarrollaron 8.50 nudos en promedio (**tabla 18**), lo anterior evidencia que dicha citocinina promovió la mayor cantidad de nudos. Sin embargo, no se observó relación entre el número de nudos y la longitud del brote en el crecimiento de las zonas apicales.

Por otro lado, la diferencia entre los controles fue la utilización de dos tipos de gelificante, en el T1 se utilizó agar y en el T4 gellan gum. La formación de yemas o raíces bajo condiciones *in vitro* está altamente influenciada por la consistencia física del medio de cultivo (Iannicelli y Salvio, 2015); sin embargo, Nairn y colaboradores (1995) atribuyen los efectos negativos del agar sobre el crecimiento de las plántulas de *Pinus radiata* a la constitución química del gelificante y no a sus propiedades físicas. Asimismo, se debe considerar que la disponibilidad de los nutrientes está altamente afectada por el

potencial agua del medio y en esto el soporte utilizado es fundamental (Iannicelli y Salvio, 2015). Como se observa en la **tabla 18**, los dos tipos de gelificantes utilizados en este tipo de explante, no intervinieron en las respuestas de las tres variables analizadas (número de brotes por explante, número de nudos y longitud del brote), indicando que las citocininas fueron las causantes de las distintas respuestas obtenidas.

Tabla 18. Promedios de los diferentes tipos de respuestas de las regiones apicales en los diferentes tratamientos a los 60 días de cultivo.

Tratamiento (mg/L)	Explantos con brotes	Número de brotes /explante ¹	Número de nudos ²	Longitud del brote ³ (cm)
T1 0	3/10 (30%)	0.80±0.44 b	6.90±1.40 a	4.88±1.06 a
T2 BA 0.5	9/10 (90%)	3.10±0.98 a	8.10±2.60 a	1.32±0.29 c
T3 BA 2.0	9/10 (90%)	2.40±0.61ab	7.00±1.28 a	1.20±0.26 c
T4 0	5/10 (50%)	0.70±0.39 b	8.20±1.42 a	5.14±1.05 a
T5 Kin 0.5	9/10 (90%)	2.60±0.52ab	11.90±1.75 a	3.19±0.56 ab
T6 Kin 2.0	9/10 (90%)	3.00±0.69 a	8.50±1.89a	1.36±0.30 c

Para ¹, ² y ³ los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), **a** representa los valores mayores y **c** a los menores.

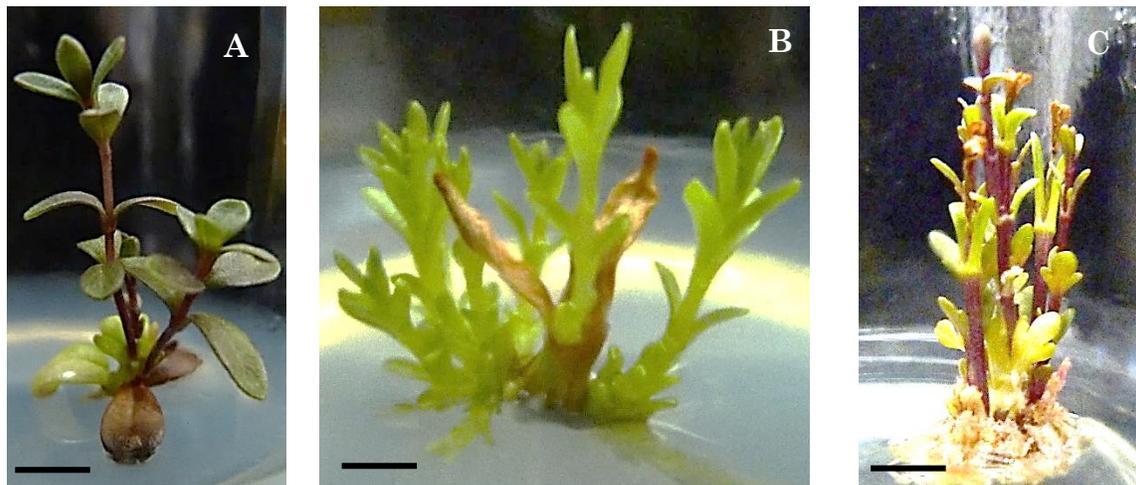


Figura 7. Formación de brotes en regiones apicales de *C. pringlei*. A) Máximo número de brotes desarrollados en el T1, B) Desarrollo de brotes en el T6, se observó un color verde homogéneo y C) Desarrollo de brotes en el T2, los tallos presentaron una coloración rojiza. Barra: 1 cm.

Asimismo, se observó una tendencia en el desarrollo de las raíces. El 60% de las regiones apicales sometidas al T1 y el 70% de las regiones apicales sometidas al T4 (ambos controles) fueron los que presentaron el mayor número de raíces (**figura 8**), con 1 (**figura 4A y B**) y de 1 hasta 3 raíces (**figura 8C y D**) por explante, respectivamente; en los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/L) y 5 (Kin 0.5 mg/L) se desarrolló una sola raíz (10%) en cada tratamiento; sin embargo, en los tratamientos 3 (BA 2.0 mg/L) y 6 (Kin 2.0 mg/L) no se observó la formación de raíces, lo cual indicó que altas concentraciones de citocininas inhibieron o retardaron la formación de raíz. También evitaron su crecimiento y el efecto promotor de las auxinas sobre la iniciación de las raíces (George, 2008).

Resultados similares se obtuvieron en *Dahlia* sp. (Aguilar, 2007) en donde la autora reportó que los explantes apicales sólo formaron raíces en ausencia de RCV o con baja concentración de kinetina (0.5 mg/L), lo que puede indicar la presencia de auxinas endógenas en los explantes, ya que la iniciación de primordios radicales generalmente requiere una concentración de auxina más alta que de citocinina (Pierik, 1990).

La aparición de callo se observó en todos los tratamientos (excepto en el T1), el cual inició principalmente en las áreas de corte (**figura 9**). Los tratamientos con citocininas fueron los que desarrollaron un callo abundante, esponjoso que pudo variar de blanco, verde y con zonas de una pigmentación rojizalo que podría reflejar el efecto de estrés para el tejido por acción de la luz y por la presencia de los RCV (**figura 9A y B**), lo anterior se presentó a los 20 días de inducción. Estos resultados coinciden con los obtenidos en cultivos de ápices de *Ipomoea carnea* (Márquez, 2007) y *Vigna radiata* (Anju y Pawan, 1992), en donde se presentó la formación de callo en las zonas de corte en medio de inducción adicionado con citocininas, las cuales propiciaron la formación de callo en la base de los ápices. Así mismo, cultivos de meristemos apicales y yema axilares de *Dahlia pinnata*, desarrollaron callos en presencia de concentraciones altas de ANA (Wang *et al.*, 1998).

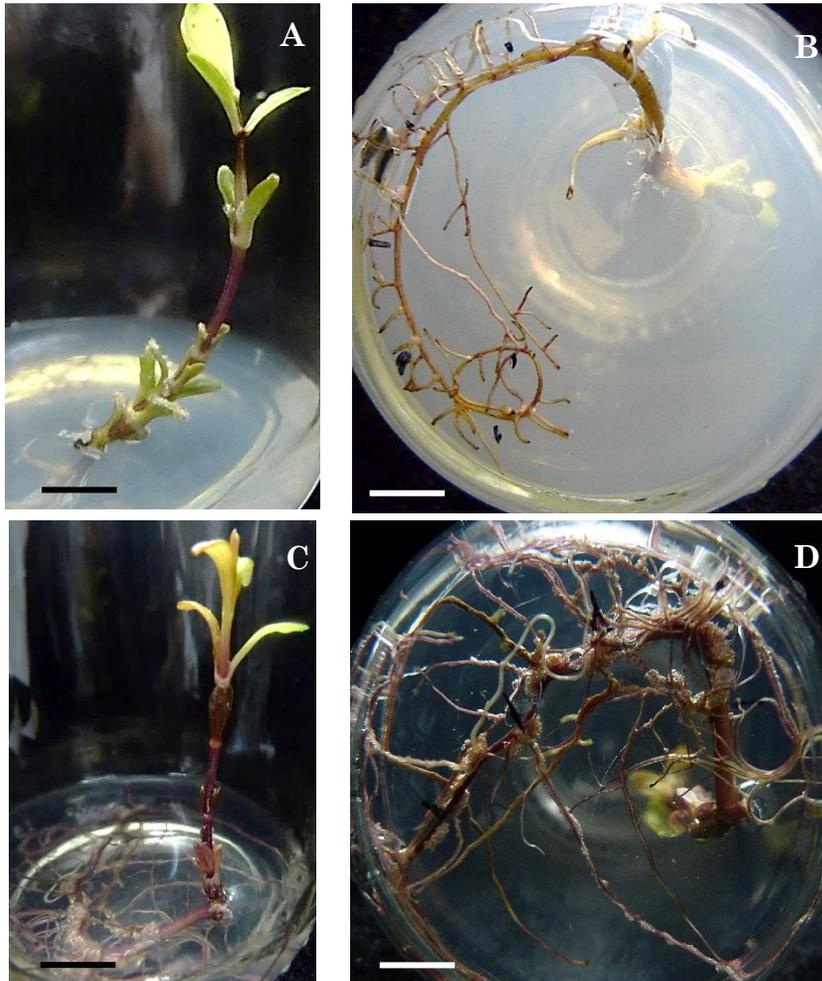


Figura 8. Plantas y raíces regeneradas a partir de regiones apicales. En el T1 (B) y T4 (D) se observó el mayor crecimiento del sistema radicular (tabla 18). En ambos tratamientos control se formó la menor cantidad de brotes, pero desarrollaron la mayor longitud del tallo (A y C, tabla 18). Barra: 1 cm.

Al término de la etapa de inducción (60 días) los callos cambiaron su apariencia, mientras que unos permanecieron esponjosos (**figura 9D**), otros se observaron disgregables o compactos; la coloración también varió de verde pálido, marrón (**figura 9C**) a un café oscuro (oxidación), este último en los callos compactos; sin embargo, la oxidación no evitó la formación de brotes adventicios (**figuras 9E y F**). Estas últimas respuestas se presentaron en el tratamiento 6 (Kin 2.0 mg/L).

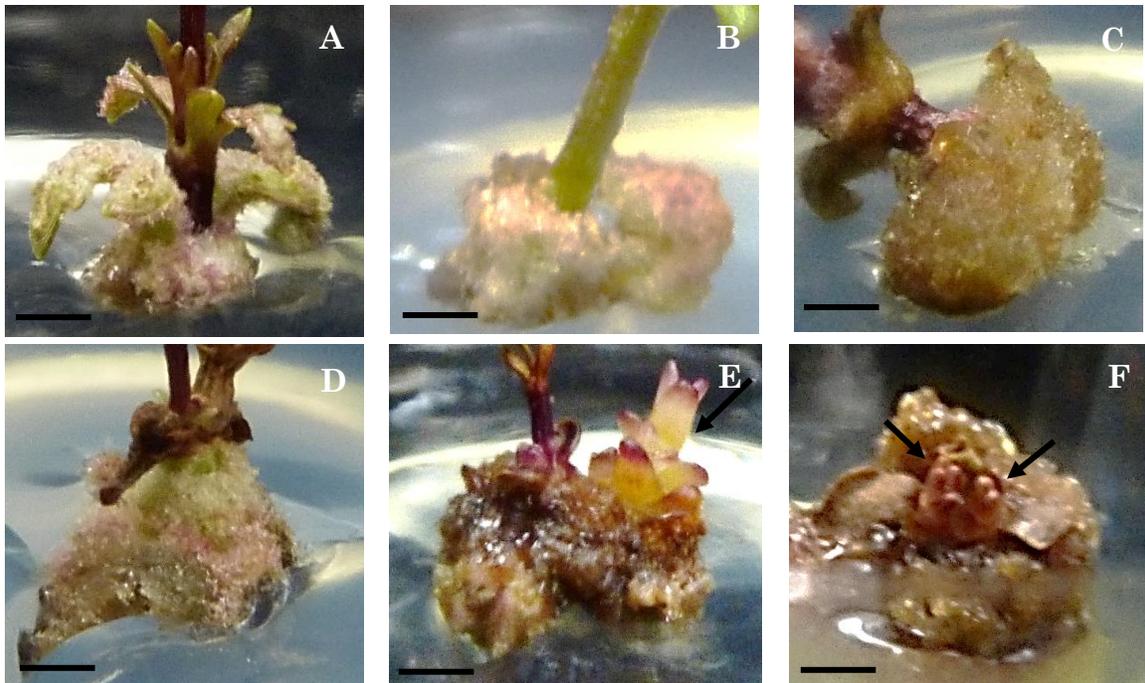


Figura 9. Formación de callo en regiones apicales. A) Callo de consistencia esponjosa obtenido del T5, B) Callo blanco con una tenue pigmentación rojiza en el T3, C) Callo friable color marrón en el T2, D) Callo esponjoso de color blanco, verde y con zonas rojizas obtenido en el T3, E) y F) Callo oxidado en el cual se observan brotes adventicios (flechas negras) en el T6. A y B callo observado a los 20 días de inducción. C, D, E y F respuestas presentes a los 60 días de inducción. Barra: 1 cm.

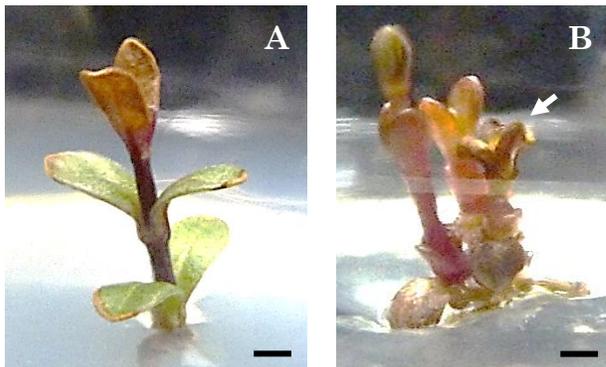


Figura 10. Necrosis presente en regiones apicales de *C. pringlei*. A) Necrosis en yemas apicales, B) Activación de yemas axilares y muerte de la zona apical (flecha blanca). Respuesta a los 23 días de iniciados los cultivos. Barra: 0.5 cm

Un problema fisiológico que se presentó en las plantulas *in vitro* de *C. pringlei* fue que varias de las yemas apicales comenzaron a necrosarse (figura 10A). La necrosis del ápice es una alteración frecuente y la principal causa de muerte de la planta que se caracteriza por el pardeamiento de las zonas apicales y las hojas. Los elementos más comunes que normalmente se asocian con la

necrosis apical son los reguladores de crecimiento vegetal, especialmente como las

citocininas BA y TDZ, estudios realizados por Mirabbasi y Hosseinpour (2014) en ápices cultivados *in vitro* de *Ulmus glabra* en medio WPM adicionado con 0.4 mg l⁻¹ BAP y en combinación con 0.05 mg l⁻¹ TDZ, observaron un aumento en la necrosis de ápices, lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en *C. pringlei* en donde la necrosis de las zonas apicales se observó en todos los tratamientos, principalmente en los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/L) y 5 (Kin 0.5 mg/L) (**figura 10B**), tratamientos con baja concentraciones de citocininas; sin embargo, esta respuesta no fue una limitante para la sobrevivencia de los cultivos. Lo anterior nos indica que la necrosis de las yemas apicales puede verse afectada por el tipo y baja concentración de las citocininas. Otros factores que intervienen en este tipo de desorden son los niveles de calcio y boro; así como la reducción de las citocininas endógenas en las zonas apicales (Mirabbasi y Hosseinpour, 2014).

Los brotes generados a partir de la activación de las yemas axilares formaron tallos delgados que en su mayoría eran de color rojizo y sin tricomas. Hojas simples y/o lobadas (3) presentes en el mismo tallo, glabras en la parte adaxial y abaxial, los márgenes fueron enteros, peciolo imperceptible y con filotaxia opuesta y decusada, muy similares a los ejemplares silvestres.

7. Evaluación de la activación de las yemas axilares y el crecimiento de los brotes en nudos.

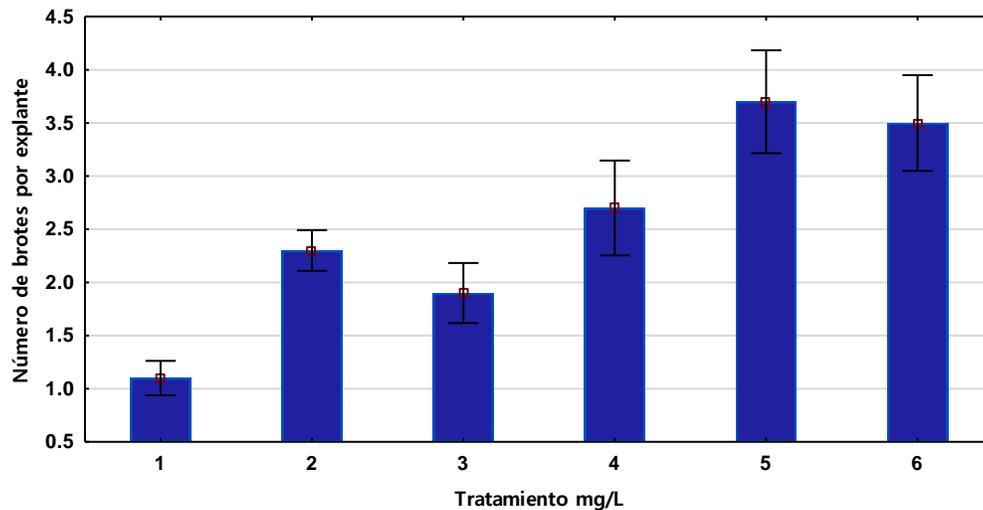
En comparación con las regiones apicales que no presentaron una afinidad por la concentración ni por una citocinina, los explantes nudo presentaron más afinidad por la kinetina, aunque no por la concentración (**tabla 19**). Los brotes axilares se desarrollaron en todas las concentraciones de BA y Kin, sin embargo, el medio de inducción que contenía la Kin fue más eficaz que el medio con BA para inducir la proliferación de las yemas axilares (**tabla 19**).

Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos a los 60 días de iniciar la etapa de inducción, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p \leq 0.05$). El promedio de brotes por explante fue mayor en los tratamientos 5 (0.5 mg/L) y 6 (2.0 mg/L) con 3.7 y 3.5 respectivamente, en comparación con el tratamiento 1 (control) el cual presentó la menor cantidad de brotes; lo anterior indicó, al igual que las regiones apicales, que la presencia de las citocininas indujeron la proliferación y activación de las yemas axilares y que ambas concentraciones de Kin (0.5 y 2.0 mg/L) ejercieron una gran influencia en la brotación activando las yemas axilares.

Cabe recordar que se utilizaron dos tipos de gelificantes, uno fue el agar (T1, T2 y T3) y el otro fue el gellan gum (T4, T5 y T6) que, de acuerdo a Nairn y colaboradores (1995) la constitución química del gelificante puede influenciar la formación de yemas o raíces en los cultivos. Por tal motivo, ambos controles (T1 y T4) al presentar diferentes tipos de gelificantes obtuvieron distintos promedios en el número de brotes.

En *C. atrosanguineus*, existen cuatro reportes de su cultivo *in vitro*, en uno de éstos, los explantes utilizados fueron los entrenudos (comunicado del Dr. J. R. Howarth, 1994), en los otros tres trabajos utilizaron nudos (Ortega-Larrocea, 1996; Hosoki *et al.*, 2003 y Kozak *et al.*, 2013), los cuales fueron cultivados en medio MS o MS modificado adicionados con diferentes concentraciones de citocininas únicamente o en combinación con auxinas. Ortega-Larrocea (1996) cuantificó el potencial regenerativo de los nudos a los 3 meses en medio de proliferación MS adicionado con 2 mg/L de BA + 0.1 mg/L de ANA, en donde obtuvo 60 plántulas por yemas axilares, brotes adventicios y/o morfogénesis indirecta. Por otro lado, Hosoki y colaboradores (2003) utilizaron 4 concentraciones distintas de BA (0, 0.44, 0.88 y 4.40 μM) en MS modificado, el número de brotes incrementó linealmente conforme aumentaba la concentración de BA obteniendo un promedio de 4.2 brotes por explante con 4.4 μM ; sin embargo, esta concentración ocasionó hiperhidratación en los tejidos.

Nuestros datos difieren de los arriba mencionados, ya que si bien, con BA obtuvieron buenos resultados en la activación de las yemas axilares, en nuestra investigación, en nudos de *C. pringlei*, los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos en los que se utilizó Kin (**gráfica 4**). La formación de brotes inducida específicamente por la Kin, es una respuesta que no había sido descrita en el género *Cosmos*.

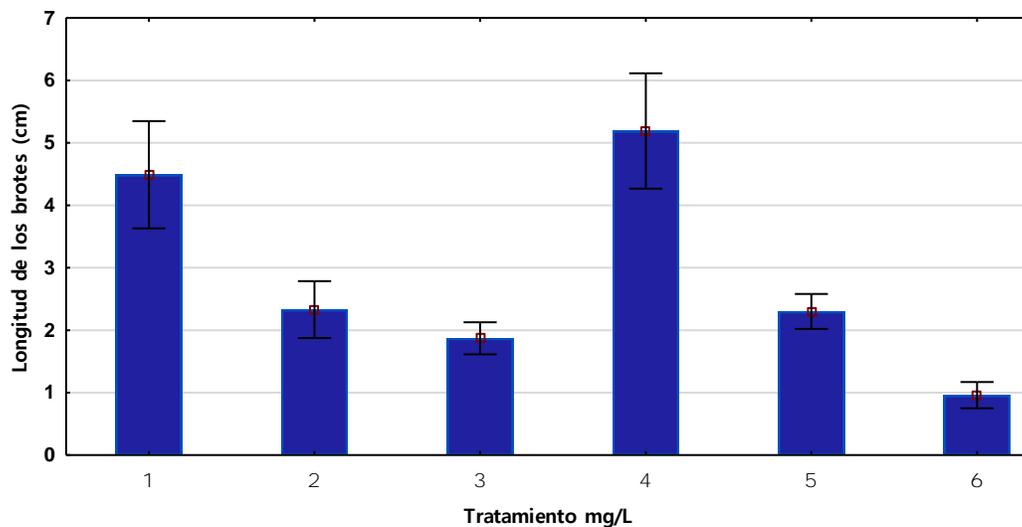


Gráfica 4. Promedio del número de brotes obtenidos por explante a partir de nudos de *C. pringlei*. Datos obtenidos a los 60 días de siembra.

En cuanto a la cantidad de nudos formados en los brotes, a los 60 días de inducción, en los tratamientos adicionados con gellan gum (T4, T5 y T6) se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). El tratamiento 4 (control) fue el que presentó el promedio más alto de los seis tratamientos con 11.90; por el contrario, el tratamiento 6 (Kin 2.0 mg/L) fue el que presentó el promedio más bajo con 6.60 nudos. Los tratamientos con agar (T1, T2 y T3) no presentaron diferencias significativas y el promedio fue muy cercano entre los tres tratamientos (**tabla 19**). Lo anterior indica que ambas citocininas, en los brotes obtenidos en este tipo de explante, no tuvieron efecto en el número de nudos; en otras palabras, el control endógeno de las fitohormonas en los brotes es capaz de contrarrestar el efecto de las citocininas exógenas (Kakimoto,

2003). Una diferencia importante es el tipo de gelificante utilizado, ya que se han observado mejores resultados en la utilización de gellan gum en plantas herbáceas, que la utilización de agar (George, 2008).

Se observaron diferencias significativas en la longitud de los brotes (**tabla 19**). Los controles (T1 y T4) fueron los que desarrollaron el mayor crecimiento con 4.49 y 5.19 cm (**gráfica 5**), respectivamente, indicando que la presencia de las citocininas inhibió el crecimiento de los brotes. En el tratamiento 4 se observó una relación entre el número de brotes y la longitud, debido a que presentaron los mayores promedios para ambos parámetros analizados. En *C. atrosanguineus* se presentaron resultados similares, Hosoki y colaboradores (2003) observaron diferencias significativas en la disminución en la longitud de los brotes en la concentración más alta de BA (4.4 μM) comparada con el resto de las concentraciones (0, 0.44, 0.88 μM).



Gráfica 5. Promedios de crecimiento en los brotes generados a partir de nudos en *C. pringlei*. Datos obtenidos a los 60 días de siembra.

Tabla 19. Porcentajes y promedios de los diferentes tipos de respuestas en nudos en los diferentes tratamientos a los 60 días de cultivo.

Tratamiento (mg/L)	Explantos con brotes	Número de brotes/explante ¹	Número de nudos ²	Longitud del brote ³ (cm)
T1 0	9/10 (90%)	1.10±0.17 c	7.50±1.10 ab	4.49±0.95 a
T2 BA 0.5	10/10 (100%)	2.30±0.21 b	8.70±1.34 ab	2.33±0.50 b
T3 BA 2.0	10/10 (100%)	1.90±0.31 bc	9.20±1.51 ab	1.87±0.28 b
T4 0	10/10 (100%)	2.70±0.49 ab	11.90±2.18 a	5.19±1.02 a
T5 Kin 0.5	10/10 (100%)	3.70±0.53 a	8.60±0.77 ab	2.30±0.31 b
T6 Kin 2.0	10/10 (100%)	3.50±0.50 a	6.60±1.11 b	0.96±0.23 b

Para ¹, ² y ³ los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), a representa los valores mayores y c a los menores.

El desarrollo del sistema radicular en la base de los nudos se observó únicamente en los controles, en el 50 % de los explantes sembrados en el T1 (**figura 11B**) y en el 40% de los explantes sembrados en el T4, al cabo de los 60 días de inducción. Estos resultados confirmaron las observaciones realizadas en las regiones apicales de *C. pringlei*, indicando que la presencia de citocininas inhiben el desarrollo de las raíces, pero estimulan el crecimiento de los brotes (**tabla 19**).

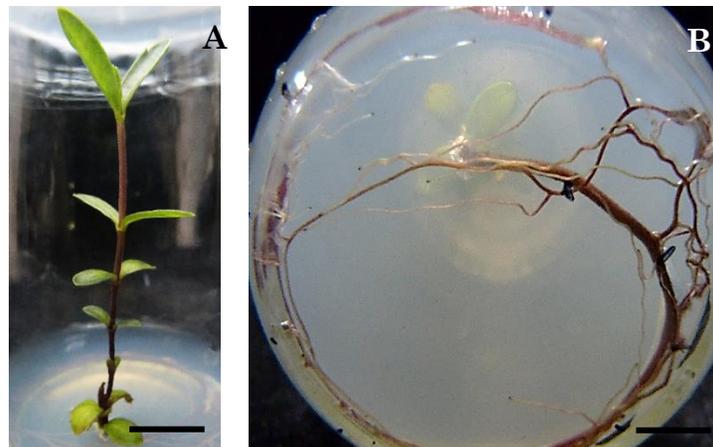


Figura 11. Brote A) y raíz B) regenerados a partir de un nudo sometido al tratamiento 1 a los 30 día de cultivo. Barra: 1 cm.

En el 98.33% de los nudos se activaron las yemas axilares, las cuales dieron origen a brotes con tallos delgados y en su mayoría de color rojizo como respuesta al estrés del tejido por acción de la luz. Las yemas latentes pueden ser estimuladas por diversos factores internos (dominancia apical inexistente) y externos (aplicación exógena de RCV principalmente de citocininas), que contribuyen a la enorme diversidad de arquitecturas de las plantas en la naturaleza y a las respuestas de las plantas a su medio ambiente (Prusinkiewicz *et al.*, 2009).

Una característica importante es que en la mayoría de los nudos en los que se observaron ambas yemas axilares, uno de los brotes creció más rápido que el otro (**figura 12A**); en los nudos en los que sólo se presentó una yema axilar, el brote activó, a su vez, una o las dos yemas axilares (**figura 12B**). En un segmento de tallo decapitado con 2 ramas, una rama normalmente domina a la otra. Además, el crecimiento continuo de ambas ramas se observó en varios casos. En el caso más simple, la yema axilar más cercana al sitio de la decapitación comienza a crecer, siendo expuesta a la reducción drástica de la auxina y asume el control como el eje dominante. El suministro de la auxina desde el eje principal se sustituye a continuación por la auxina de la yema axilar activada (Prusinkiewicz *et al.*, 2009).

La oxidación fue del 50%; sin embargo, este fenómeno no se presentó en los explantes originales sino en la zona apical de los brotes generados (**figura 12C**). El mayor porcentaje de oxidación se presentó en los tratamientos 5 (0.5 mg/L) y 6 (2.0 mg/L), en los cuales estaba presente la kinetina. La respuesta obtenida en los brotes generados a partir de nudos fue similar a la que se presentó en las regiones apicales; sin embargo, la diferencia radica en que la necrosis en este último tipo de explante, se observó en las concentraciones más bajas de ambas citocininas (BA y Kin 0.5 mg/L), lo cual evidencia que la necrosis de la yema apical puede verse afectada por el tipo y concentración de las citocininas (Mirabbasi y Hosseinpour, 2014).

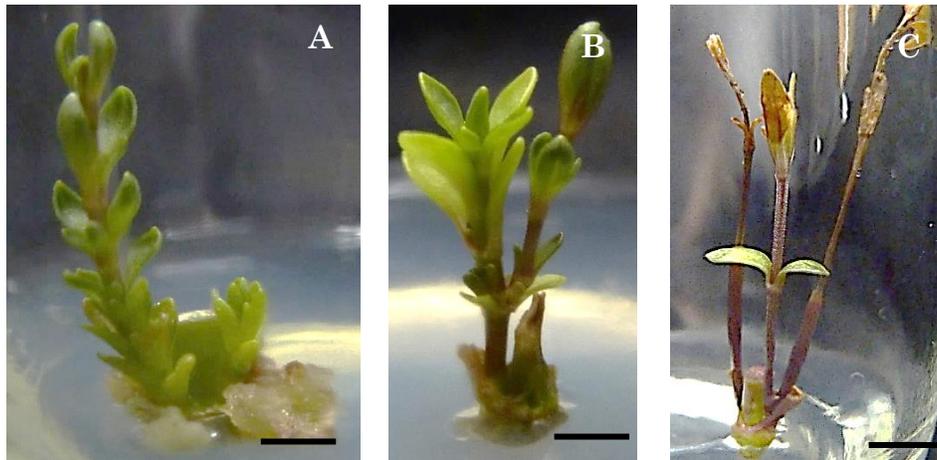


Figura 12. Brotes generados a partir de yemas preformadas en nudos. A) Diferencia en el crecimiento de ambos brotes (T3), B) Activación de yemas a partir del primer brote generado (T2) y C) Brotes generados en donde se observa las yemas apicales necrosadas (T4). Barra: 1 cm.

Por otro lado, el desarrollo del callo se observó en la zona basal de los explantes en todos los tratamientos, el cual pudo variar de hialino a blanco (**figura 13A**), verde (**figura 13B**), marrón (**figura 13C**) y algunos presentaban zonas de pigmentación rojiza (**figura 13D**), de consistencia friable, lo anterior se presentó a los 30 días de siembra. De acuerdo con Marks y Simpson (1994) la formación de callo puede deberse a la acción de la auxina acumulada en la zona basal del explante donde se realizó el corte, lo que estimula la proliferación celular especialmente en la presencia de citocininas. Preece y colaboradores (1991) sugieren que la formación del callo en la zona de corte basal de los explantes nodales cultivados en medios enriquecidos con citocininas, se presenta frecuentemente en especies que ejercen una fuerte dominancia apical.

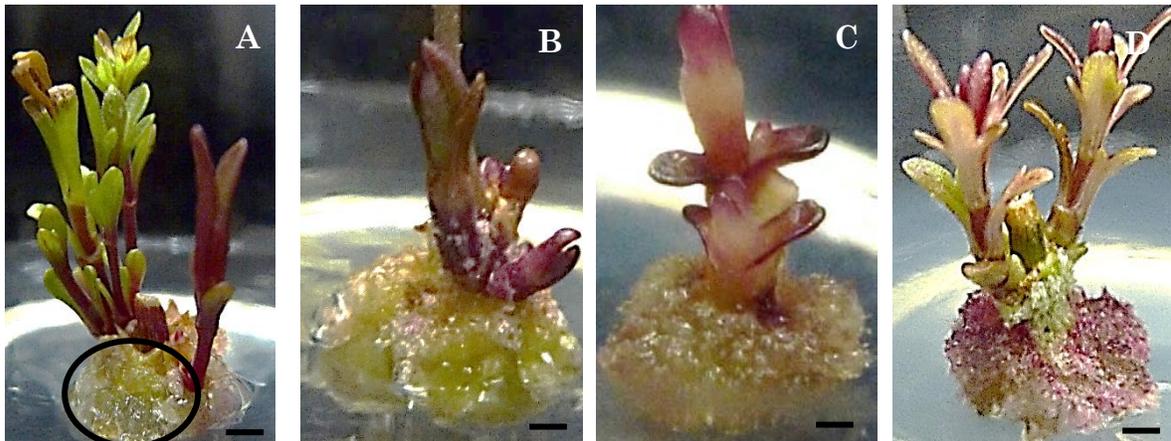


Figura 13. Desarrollo de diferentes tipos de callo en explantes nudo. A), Callo hialino (circulo) en T6 B), Callo verde en T5, C) Callo marrón en T6 y D) Callo verde con zonas rojizas en T3. Barra: 0.5 cm

8. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre hoja

De acuerdo con los resultados obtenidos en el explante hoja, solamente tres de los doce tratamientos propuestos en este estudio desarrollaron brotes, esto fueron el T2 (BA 0.5 mg/L), T3 (BA 1 mg/L) y T4 (BA 2 mg/L). Por el contrario, el resto de los tratamientos (T1, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12) no presentaron respuesta en cuanto a la formación de brotes (**tabla 20**). Por lo anterior, los tratamientos que obtuvieron respuesta (T2, T3 y T4) fueron sometidos a un análisis estadístico los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Es de importancia hacer notar que los tratamientos que regeneraron brotes fueron los que presentaron únicamente la citocinina en ausencia de la auxina, y que el tratamiento con la mayor concentración de ésta, fue el que obtuvo mayor número de brotes (0.20 ± 0.63). Hosoki y colaboradores (2003) obtuvieron respuestas semejantes a la nuestra con los explantes de hoja en *Cosmos atrosanguineus*, en donde obtuvieron porcentajes de regeneración del 10% y únicamente con BA (1.0 regenerantes por brote), en las concentraciones de 4.4 y 18.0 μM (1.0 mg/L y 4.0 mg/L respectivamente).

Se presentaron diferencias numéricas entre los tratamientos 2 y 3 (un brote cada uno) y el tratamiento 4 (**figura 14F**) que regeneró el doble (**gráfica 6**), lo anterior en un solo explante. Lee y colaboradores (1994) desarrollaron un procedimiento para la regeneración de *Coreopsis lanceolata* L. a partir de explantes de hoja, en donde realizaron un estudio con los reguladores de crecimiento ANA y BA, solos y en combinación. Los resultados arrojaron que todos los tratamientos que presentaron la citocinina generaron brotes y que cuando estuvo ausente dicha citocinina se inhibía completamente la regeneración. Aunque el porcentaje de formación de brotes aumentó ligeramente con el incremento en la concentración de la citocinina (de 5 a 20 μM), fue difícil señalar la mejor combinación de ANA y BA para utilizar en la etapa de regeneración.

Como se observa en la **gráfica 6**, el tratamiento control, no generó respuesta en la formación de brotes aún con la presencia de fitohormonas, lo cual evidencia que los niveles de estos compuestos varían dependiendo de la especie vegetal, el genotipo, el tipo de explante y el estadio de desarrollo. Al adicionar la citocinina sintética (BA) en el resto de los tratamientos, contribuyó en encontrar un balance con la auxina endógena para la formación de los regenerantes (Ćosić *et al.*, 2015).

Por otro lado, la aplicación de reguladores de crecimiento exógenos, como en este caso fue el ANA/BA, afectó los niveles de hormonas endógenas, influyendo en su biosíntesis y su distribución, alterando la respuesta *in vitro* (Ćosić *et al.*, 2015), lo cual probablemente ocurrió en el resto de los tratamientos en donde no se consiguió un balance para la obtención de los brotes adventicios, ya que el balance auxinas/citocininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr este balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación (Pérez *et al.*, 1998).

Sin embargo, en el tratamiento 5, el cual solamente contenía la auxina (ANA 0.5 mg/L), se presentó el desarrollo de raíces adventicias en el 30% de los explantes (datos no mostrados). Aguilar (2007) quien realizó el cultivo *in vitro* de *Dahlia sp* reportó que el ANA promovió la inducción de raíces e inhibió la caulogénesis al utilizar una concentración de 0.5 mg/L de dicha auxina.

El efecto de los reguladores de crecimiento exógenos, especialmente de la citocininas, sobre la organogénesis de *novó* puede variar debido a las diferencias en la absorción del medio de cultivo, así como la capacidad del genotipo o inclusive el tipo de explante que metaboliza a las citocininas (Čosič *et al.*, 2015).

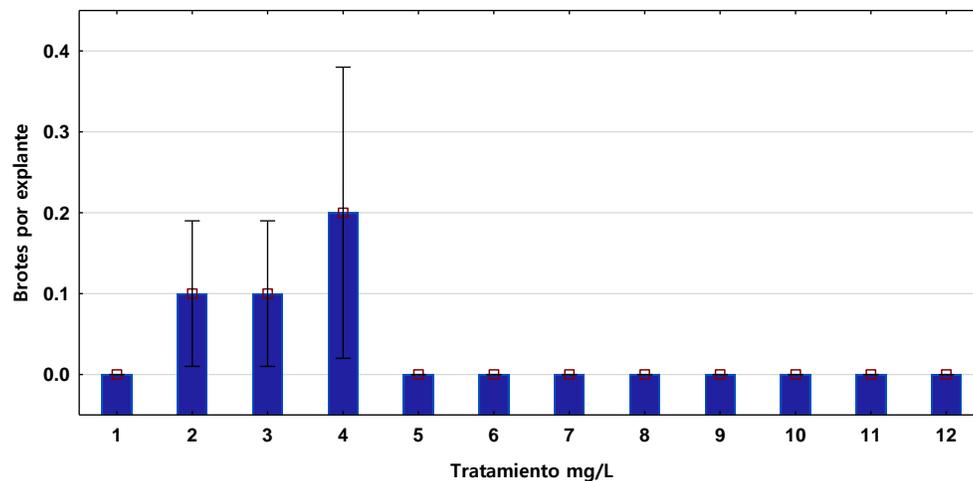
En cuanto a la longitud de los brotes, se presentó una relación directa; es decir, conforme aumentaba la concentración del BA aumentaba la longitud del brote (**gráfica 7**), sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los tres tratamientos (**tabla 20**). Por lo tanto, al agregar citocininas al medio de cultivo se puede dirigir el desarrollo del material vegetal porque estimula la división celular, la formación de yemas y el crecimiento de los brotes (Jankiewicz, 2003).

El desarrollo del callo comenzó a observarse a partir de los 10 días de inducción, el cual inició en la zona de corte (**figura 14A**), y en algunos explantes, continuó su desarrollo por la vena central en ambos lados de la hoja. A los 60 días de inducción, el 85% de los explantes generaron callo.

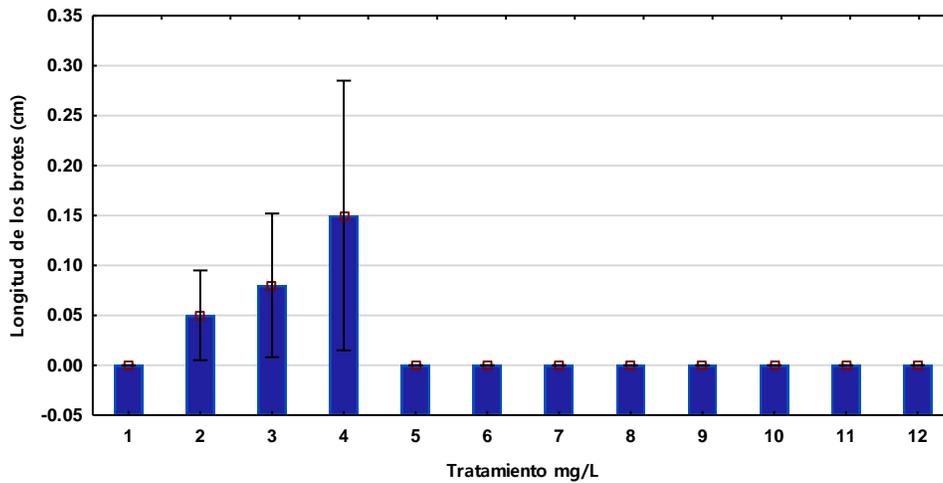
Tabla 20. Promedios y porcentajes de las diferentes respuestas desarrolladas en hoja en los diferentes tratamientos a los 60 días de inducción.

Tratamiento ANA/BA (mg/L)	Número de explantes con brotes	Número de brotes/explante ¹	Longitud del brote ² (cm)	Número de explantes con callo	Porcentaje de callo
T1	0/10	0±0	0±0	3/10	12.5 b
T2	0/0.5	0.10±0.10 a	0.05±0.05 a	10/10	42.5 a
T3	0/1	0.10±0.10 a	0.08±0.08 a	9/10	45 a
T4	0/2	0.20±0.20 a	0.15±0.15 a	10/10	45 a
T5	0.5/0	0±0	0±0	8/10	32.5 a
T6	0.5/0.5	0±0	0±0	10/10	42.5 a
T7	0.5/1	0±0	0±0	10/10	37.5 a
T8	0.5/2	0±0	0±0	10/10	30 ac
T9	1/0	0±0	0±0	7/10	27.5 abc
T10	1/0.5	0±0	0±0	10/10	35 a
T11	1/1	0±0	0±0	5/10	15 bc
T12	1/2	0±0	0±0	10/10	40 a

Para ¹ y ² los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), a representa los valores mayores y c a los menores.



Gráfica 6. Formación de brotes *in vitro* a partir de hojas de *C. pringlei* en los tratamientos 2, 3 y 4, a los 60 días de inducción.



Gráfica 7. Crecimiento de los brotes regenerados *in vitro* a partir de hojas de *C. pringlei* en los diferentes tratamientos a los 60 días.

En todos los tratamientos se observó un callo de consistencia esponjosa y compacta y algunos explantes presentaban el desarrollo de nódulos (**figura 14B**) que no generaron la formación de brotes adventicios. La coloración pudo ser de blanco, verde a una pigmentación morada (**figura 14C, D y E**). Al final de la etapa de inducción, el volumen del callo no aumentó de manera significativa, sin embargo, un cambio notable fue la coloración de éste a una pigmentación morada, marrón y café oscuro (**figura 14F**), este último se manifestó como un oscurecimiento del tejido vegetal en el 50% de los explantes y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves necrosis y muerte del tejido (Sharry *et al.*, 2015).

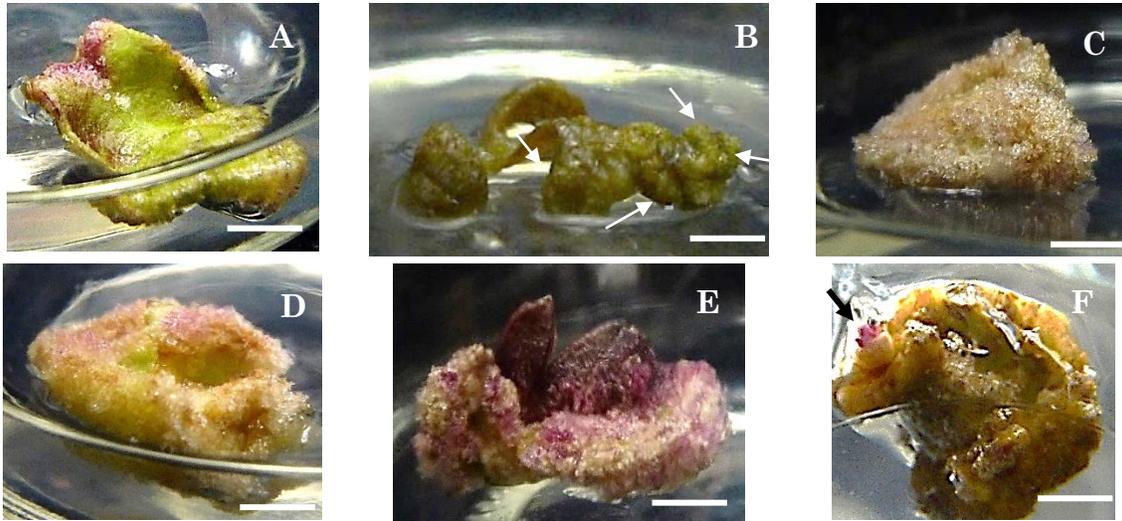


Figura 14. Desarrollo de callo en explantes de hoja de *C. pringlei*. A) crecimiento de callo a partir de la zona de corte (T7), B) formación de nódulos en T4 (flechas blancas), los cuales no regeneraron brotes adventicios, C) callo esponjoso de coloración hialino a blanco (T11), D) callo esponjoso de tonalidades blanco-marrón y zonas de pigmentación morada (T2), E) callo esponjoso de color morado (T4) y F) callo compacto de color marrón a café oscuro (oxidación) con el desarrollo de un brote adventicio (T4, flecha negra). A, B, C, D y E desarrollo de callo a los 30 días de inducción, F callo y brote a los 60 días de inducción. Barra: 1 cm.

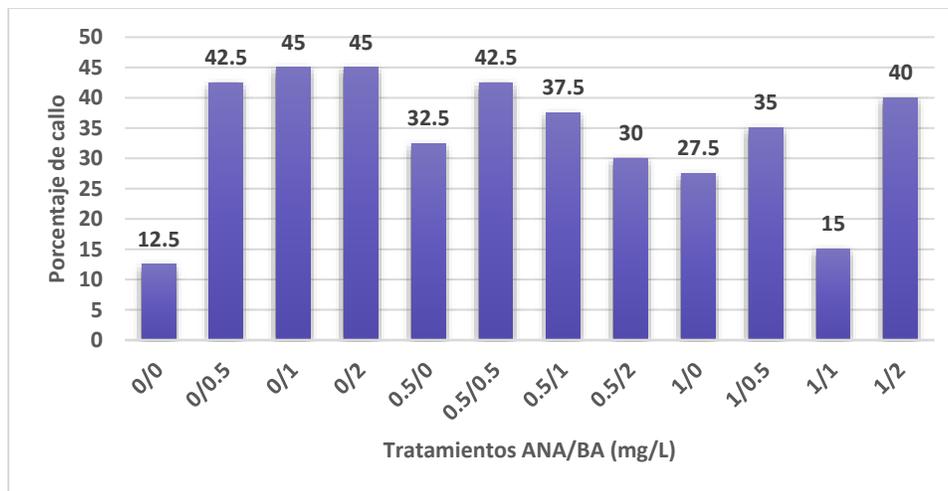
La integridad de los tejidos se conservó en todos los explantes, de tal forma que los reguladores de crecimiento promovieron la división celular y la formación de células indiferenciadas, cuyo lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente se desarrolló en la superficie del explante o en la zona de corte (Pérez Ponce, 1998), o bien, en la venación superior o inferior respecto a la superficie de la hoja.

Como se observa en la **gráfica 8**, todos los tratamientos presentaron el desarrollo de callo el cual, como mencionó Pérez Ponce (1998), se forma solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina "potente" (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, dicamba, picloram); sin embargo, en nuestra investigación, los porcentajes más altos se observaron en los tratamientos que presentaron únicamente BA (T2, T3 y T4) demostrando que no es necesario la aplicación externa de auxinas, pues la hojas jóvenes

cultivadas poseen una biosíntesis intensa de auxinas (Taiz y Zeiger, 2006) que interactúan con las citocininas externas (Cline, 1976).

En los tratamientos 6 (0.5/0.5 mg/L ANA/BA) y 12 (1/2 mg/L ANA/BA) también se presentó un porcentaje alto de callo, lo cual sugiere una interacción entre los RCV y las hormonas endógenas que permitió su desarrollo.

Por si mismos, los vegetales tienen un potencial endógeno para la formación del callo, pues en su medio natural, al sufrir una lesión en un órgano, ésta es reparada por este tejido. De especie a especie se presenta una variación en esta capacidad, misma que se refleja en las respuestas *in vitro* a la inducción de callo, encontrándose tejidos para los que, el inducirlos al callo es requisito el suplemento de una auxina o un regulador de crecimiento relacionado; otros requieren solo una citocinina o un suplemento, tanto de auxina como de citocinina (Sharry *et al.*, 2015).



Gráfica 8. Desarrollo de callo formado a partir de explantes de hoja de *C. pringlei*, a los 60 días de inducción.

9. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre entrenudos

La formación de brotes adventicios se observó a partir de los 30 días de iniciar la etapa de inducción, esta regeneración ocurrió vía organogénesis directa. La formación de brotes ocurrió en el control (T1) y en los tratamientos 2 y 4 sin que éstos presentaran una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a los 60 días de cultivo (**tabla 21**).

Los explantes presentaron porcentajes bajos en la formación de brotes, el tratamiento 1 (control) y 2 obtuvieron el 20%, mientras que el tratamiento 4 obtuvo el 10%, sin embargo, en este último tratamiento, se presentó el mayor promedio de brotes por explante con 0.4, seguido del tratamiento 2 con 0.3 y el control (T1) con 0.2 (**gráfica 9**). Los resultados anteriores concuerdan con los explantes de hoja, en que los tratamientos en los que se observó la regeneración de brotes fueron los que presentaron únicamente la citocinina (BA) y que el tratamiento con la mayor concentración de ésta (T4 con 2 mg/L) fue el que presentó el mayor promedio (**tabla 21**); sin embargo, una de las diferencias entre ambos tipos de explantes, fue la regeneración de brotes en el tratamiento control (T1) en los entrenudos y no así, en las hojas. De esta forma, en el T1 no fue necesaria la aplicación externa de ambos reguladores de crecimiento para la formación de brotes. La interacción de las fitohormonas endógenas fue capaz de estimular la regeneración. Pierik (1990) menciona que en los tejidos de las plantas existen gradientes de regeneración en función del tipo y la posición del explante en la planta.

Hosoki y colaboradores (2003) reportaron la regeneración a partir del cultivo *in vitro* de secciones de tallo en *C. atrosanguineus* y encontraron que la capacidad de regeneración de los entrenudos era mayor que la de las hojas. Los mejores promedios se observaron en los dos tratamientos que presentaban únicamente la citocinina (4.4 y 18 μM de BA) y en dos de los tratamientos que contenía la combinación auxina/citocinina (0.17/4.4 μM de ANA/BA y 0.17/18 de ANA y BA). De igual forma, en el cultivo *in vitro* de *Dahlia* sp., Aguilar (2007) observó que el mayor número de brotes se presentó en los

explantes cultivados sin ANA, y que este tratamiento promovió además la longitud de los brotes.

El promedio en cuanto al crecimiento de los brotes fue totalmente lo contrario. En los tratamientos que presentaron la citocinina, el T4 fue el que presentó el menor crecimiento con un promedio de 0.05 cm y el T2 obtuvo un promedio de 0.22 cm, mientras que el T1 (control) arrojó un promedio de 0.08 cm, al realizar los análisis estadísticos, éstos no arrojaron diferencias significativas entre los tres tratamientos (**tabla 21, gráfica 10**), sin embargo, las diferencias numéricas podrían indicar que altas concentraciones de citocininas exógenas inhiben el crecimiento de los brotes (Jankiewicz, 2003).

La zona en la cual se observó la presencia de los brotes fue diferente en cada explante. Algunos brotes, como en el tratamiento 2, se formaron en los extremos del tallo, específicamente en las zonas de corte, en donde se observó la presencia de nódulos que posteriormente se desarrollaron en brotes (**figura 15A**). En el tratamiento 1 la emergencia del brote comenzó en el centro del explante, en el que se observó una coloración morada muy intensa que terminó en la oxidación del tejido (**figura 15B**).

Por otro lado, es importante mencionar que en los tratamientos 5 (0.5 mg/l ANA) y 9 (1 mg/L ANA) se observó la regeneración de raíces, mediante organogénesis indirecta, en los extremos del tallo (**figura 15C**). En *Dahlia* sp. el ANA promovió la inducción de raíces e inhibió la caulogénesis cuando se cultivaron con 0.5 mg/L de esta auxina (Aguilar, 2007). De la misma forma, en *Dendranthema grandiflora* (sin. *Chrysanthemum morifolium*) el desarrollo de las raíces, en cultivos de tallo, se limitó a aquellos tratamientos sin BA y aumentaban conforme se elevaban las concentraciones de ANA (Kaul *et al.*, 1990).

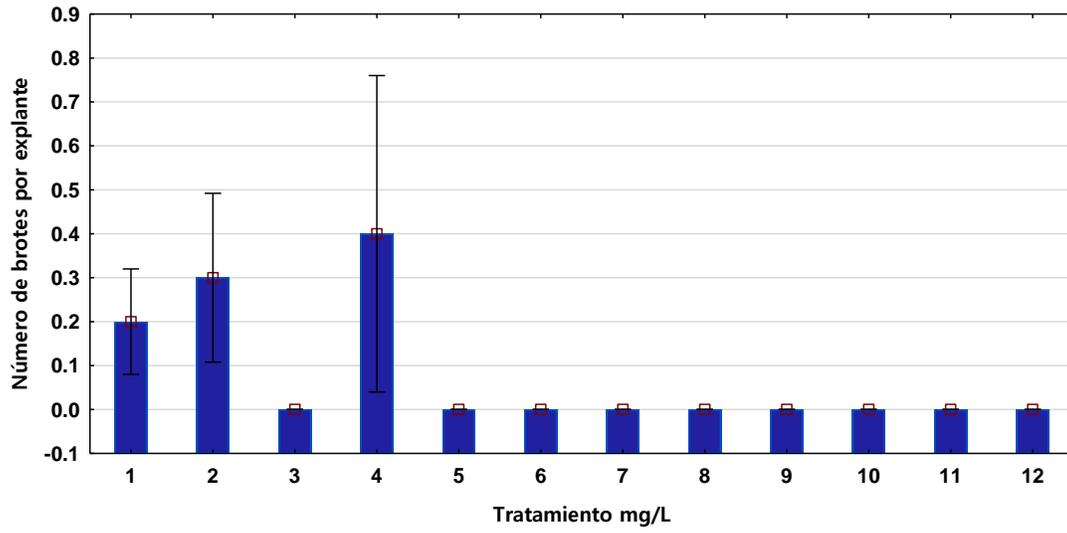
Tabla 21. Promedios y porcentajes de las diferentes respuestas desarrolladas en tallo en los diferentes tratamientos a los 60 días de inducción.

Tratamiento ANA/BA (mg/L)	Número de explantes con brotes	Número de brotes/explante ¹	Longitud del brote ² (cm)	Número de explantes con callo	Porcentaje de callo
T1	0/0	2/10	0.20±0.13 a	10/10	25 e
T2	0/0.5	2/10	0.30±0.21 a	10/10	65 ab
T3	0/1	0/10	0±0	10/10	75 a
T4	0/2	1/10	0.40±0.40 a	10/10	65 ab
T5	0.5/0	0/10	0±0	10/10	47.5 cd
T6	0.5/0.5	0/10	0±0	10/10	62.5 abc
T7	0.5/1	0/10	0±0	10/10	52.5 bcd
T8	0.5/2	0/10	0±0	10/10	57.5 bc
T9	1/0	0/10	0±0	10/10	50 bcd
T10	1/0.5	0/10	0±0	8/10	47.5 cd
T11	1/1	0/10	0±0	10/10	47.5 cd
T12	1/2	0/10	0±0	10/10	40 d

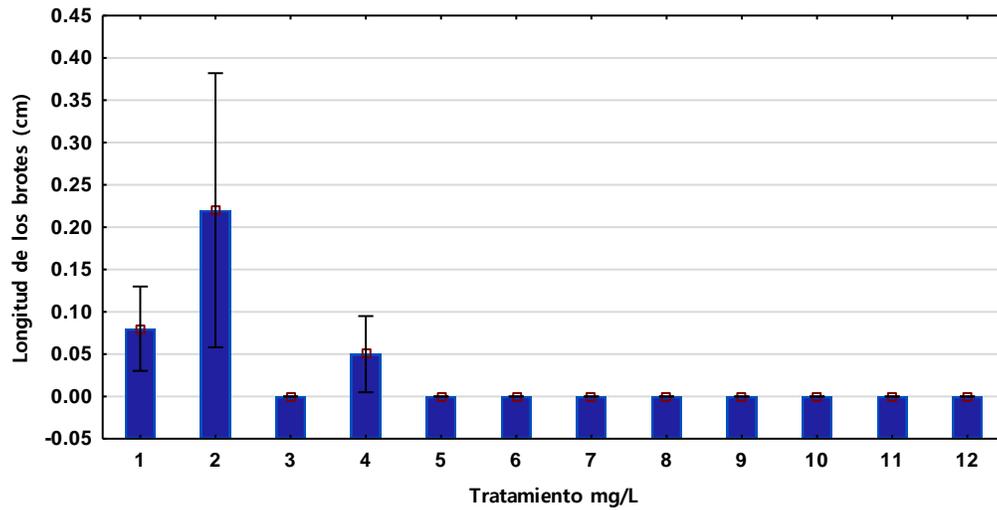
Para ¹ y ² los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), a representa los valores mayores y e a los menores.



Figura 15. Organogénesis a partir de entrenudos de *C. pringlei*. A) organogénesis directa en el T2, las flechas señalan las zonas en donde se originaron nódulos que posteriormente se desarrollaron en brotes, B) organogénesis directa en el T1, desarrollo de un brote de color morado intenso y C) organogénesis indirecta, regeneración de raíz a partir de callo (T5). Respuesta a los 30 días de inducción. Barra: 1 cm.



Gráfica 9. Formación de brotes *in vitro* a partir de tallo de *C. pringlei* en los tratamientos 1, 2 y 4, a los 60 días de inducción.

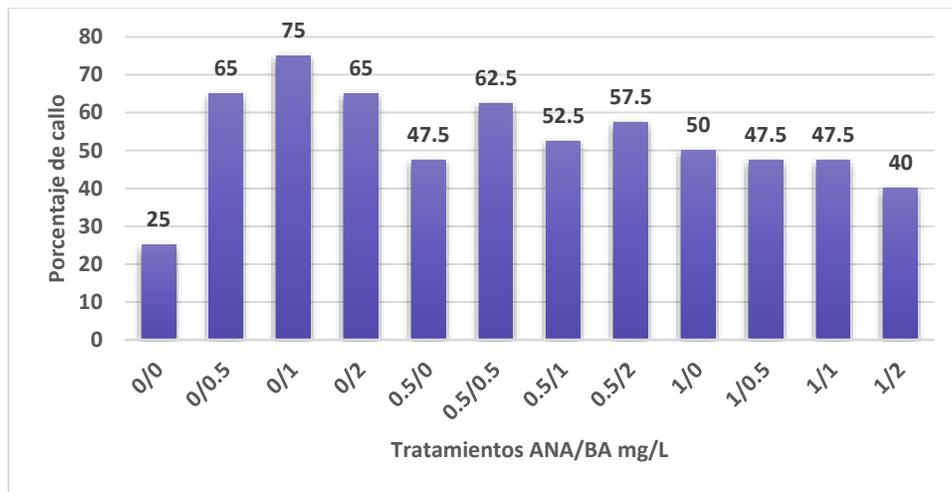


Gráfica 10. Crecimiento de los brotes regenerados *in vitro* a partir de tallo de *C. pringlei* en los diferentes tratamientos a los 60 días.

Al igual que los explantes de hoja, los tratamientos que presentaron la combinación de ambos reguladores de crecimiento (ANA/BA) o solamente la auxina (**gráfica 9**), no presentaron la formación de brotes adventicios, lo cual indica que existen diversos factores que influyen en la falta de respuesta como son los mecanismos reguladores de la información genética que causa que la morfogénesis sea inactiva o que genere diferencias en la regeneración de plantas. A su vez, esta diversidad de respuestas puede reflejarse en los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para la diferenciación; otro factor pueden ser los efectos en la posición del explante y la competencia, ya que existen fuertes diferencias entre célula y célula y entre diferentes tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivo de tejidos *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

Los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el desarrollo de callo a los 60 días de inducción en el 98.3% de los explantes, esta respuesta se observó en todos los tratamientos, aunque en el control fue escaso (**tabla 21**). Los tratamientos que presentaron estas diferencias en los porcentajes fueron los T2, T3, T4 y T6 (**gráfica 11**).

Los resultados anteriores indican que, al igual que los explantes de hojas, la aplicación únicamente de la citocinina (BA) y la combinación con la auxina (ANA) promovieron el mayor desarrollo de los callos (George *et al.*, 2008), sin embargo, en este tipo de explante (entrenudos), la aplicación únicamente de la citocinina, 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, Kin y 2iP, en donde el BA, en cualquiera de las concentraciones usadas, promovió un mayor crecimiento de callo (González, 1999).



Gráfica 11. Desarrollo de callo formado a partir de explantes de entrenudos de *C. pringlei*, a los 60 días de inducción.

El crecimiento del callo fue heterogéneo, es decir, en algunos explantes el callo comenzó a desarrollarse a lo largo (**figura 16A**), en la superficie (**figura 16B y D**), o bien, en las zonas de contacto con el medio de cultivo (**figura 16C**); en algunos otros, el desarrollo se observó en las zonas de corte o extremos de los explantes (**figura 16E**).

La integridad del tejido no se conservó en la mayoría de los explantes, de forma que los reguladores de crecimiento indujeron desdiferenciación celular y promovieron la división celular aumentando el volumen del callo (**figura 16F**). La consistencia del callo se observó desde friable, esponjosa a compacto y la coloración pudo variar de hialino, blanco, verde, morado intenso, marrón (**figura 16G**) y café oscuro (oxidación, **figura 16H**), este último, al igual que la hoja, se desarrolló con rapidez cuando los explantes se subcultivaron a medio basal provocando la muerte de más del 70% de los callos.

La oxidación se desarrolló en todos los explantes, sin embargo, en los tratamientos T6 (ANA/BA 0.5/0.5 mg/l), T3 (BA 1 mg/L) y T8 (ANA/BA 0.5/2 mg/L) se observaron porcentajes del 50%, 55% y 60% respectivamente, a los 60 días de inducción. Van Staden

y colaboradores (2006), señalan que un desbalance hormonal, debido al tipo, combinación y concentración de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo, puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que las especies reactivas de oxígeno (ERO) generados alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante, pudiendo incluso matarlo.

De acuerdo a la literatura consultada, primero las auxinas y luego las citocininas son los grupos de reguladores de crecimiento más relacionados con el problema de oscurecimiento de los explantes, dentro de las citocininas, la BA es el regulador que cuenta con mayor número de referencias que asocian su uso con el problema del oscurecimiento (Azofeifa, 2009).

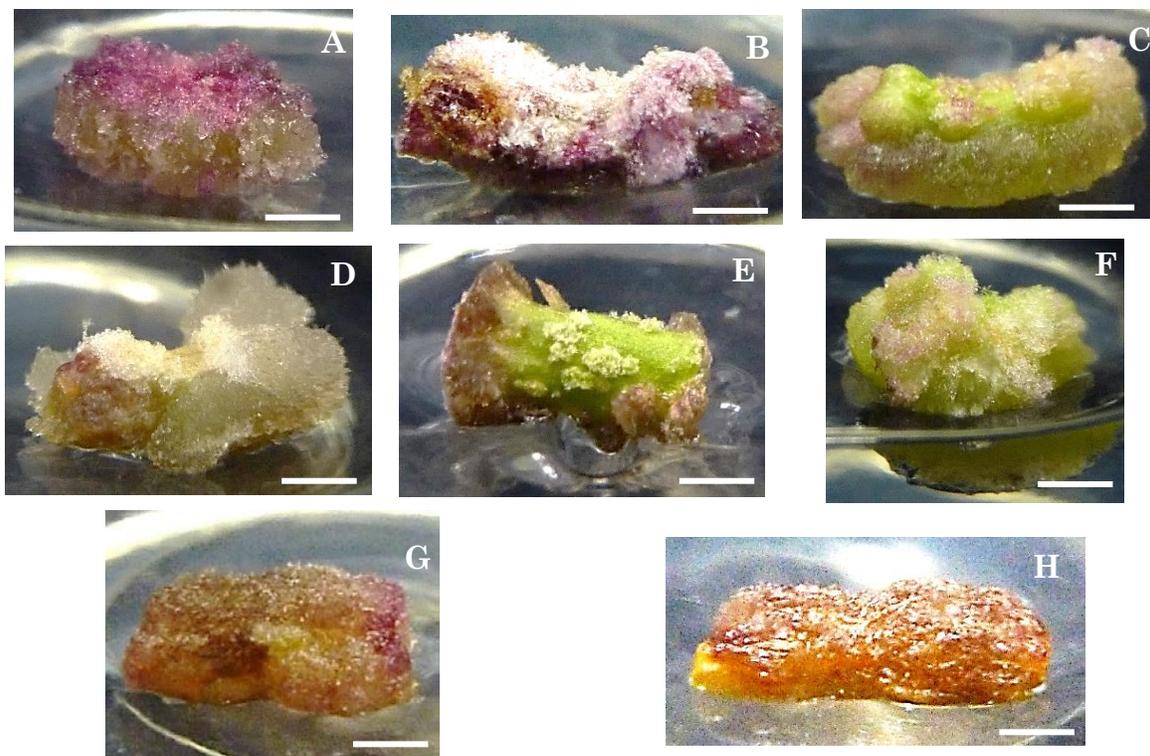


Figura 16. Desarrollo y coloración del callo observado en entrenudos de *C. pringlei*. A) T7 callo esponjoso, hiperhidratado, hialino y rojizo en la superficie, B) T9 callo blanco compacto, C) T4 callo hialino y compacto, D) T6 callo hialino hiperhidratado, E) T5 poco desarrollo de callo en el centro del explante, F) T3 explante que perdió la integridad del tejido, callo esponjoso blanquecino, G) T9 callo hiperhidratado con oxidación y H) T11 poco desarrollo de callo, tejido oxidado. Respuestas a los 30 días de inducción. Barra: 1 cm.

10. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento sobre raíz

El desarrollo de los brotes adventicios comenzó a observarse a los 35 días en medio de inducción, respuesta similar obtenida por Da Cruz y colaboradores (2014) en segmentos cultivados de raíz de *Bixa orellana* en donde el desarrollo de los brotes adventicios se observó después de 30 días de inducción.

La formación de los brotes se presentó vía organogénesis indirecta (**figura 17**) en los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/L, **figura 17A**), 3 (BA 1 mg/L, **figura 17B, C y D**), 4 (BA 2 mg/L, **figura 17E, F,G y H**) y 8 (ANA/BA 0.5/2 mg/L, **figura 17I**), los cuales fueron sometidos a un análisis estadístico mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a los 60 días de inducción; por el contrario el resto de los tratamientos no presentaron la formación de brotes (**tabla 22**). La obtención de brotes regenerados a partir de raíces vía organopogénesis indirecta también se ha reportado en *Centaurea ulreiae* (Mallón *et al.*, 2011), especie perteneciente a la familia Asteraceae; así como en otras especies de plantas como *Cleome rosea* (Simões *et al.*, 2009), *Cassia angustifolia* (Parveen y Shahzad, 2011) y *Passiflora* sp. (Silva *et al.*, 2011).

Al igual que los explantes utilizados anteriormente (hoja y entrenudo), la organogénesis se observó en los tratamientos que presentaron únicamente la citocinina (BA) además del tratamiento 8 el cual contenía ambos RCV (ANA/BA) (**tabla 22**). La concentración de BA, 2 mg/L (T4) promovió la mayor formación de brotes con un promedio de 1.3 en comparación con el T3 (1mg/L) y el T2 (0.5 mg/L) que obtuvieron los promedios de 0.3 y 0.2 respectivamente (**gráfica 12**).

La citocinina fue esencial para la diferenciación de los brotes adventicios en *C. pringlei*. Da Cruz y colaboradores (2014) demostraron que la BA fue la mejor citocinina para la diferenciación y desarrollo de *Bixa orellana* a partir de raíces, ya que dio como resultado el mayor porcentaje de plántulas regeneradas. De igual forma ocurrió en

Centaurea ulreia, en donde Mallón y colaboradores (2011) observaron que el tratamiento que obtuvo el mayor número de brotes fue con 0.55 μM de BA con un promedio de 8.86 brotes por explante, seguido del tratamiento con 2.22 μM de BA con un promedio de 7.07 brotes.

Durante la organogénesis *in vitro*, las citocininas promueven la expresión de genes esenciales para inducir la formación *de novo* de nuevos brotes (Su *et al.*, 2011). Gordon y colaboradores (2007) demostraron que la adquisición de la competencia para formar brotes en explantes de raíz ocurre en regiones que son altamente sensibles a la citocinina, pero no a la auxina, y que se requiere un balance en los gradientes de estos reguladores de crecimiento para especificar la identidad celular.

A pesar de que la presencia de auxinas es necesaria para promover la proliferación de los brotes, existe evidencia de que las auxinas pueden regular la biosíntesis de citocininas y reducir rápidamente los niveles de citocininas en las plantas (Nordstrom *et al.*, 2004). Por lo tanto, se requiere de un apropiado equilibrio entre los RCV suministrados al medio de cultivo y los niveles de las hormonas endógenas del material vegetal. En los explantes de raíz de *C. pringlei*, la combinación de 0.5 mg/L de ANA con 2 mg/L de BA fue uno de los tratamientos que regeneró menos brotes por explante (0.2). Por lo tanto, el mecanismo de acción indirecto de la auxina contrasta con los efectos directos de la BA en el desarrollo de los brotes, lo que disminuye la proliferación de los brotes (Mallón *et al.*, 2011). Lo anterior nos puede indicar la falta de balance entre las concentraciones de ANA/BA adicionados exógenamente en los tratamientos T6, T7, T10, T11 y T12; así como en los tratamientos T5 y T9 que únicamente presentaron la auxina, con las fitohormonas endógenas, como ocurrió también en el tratamiento control, al no presentar la formación de brotes.

El crecimiento de los brotes se presentó, con un mayor promedio, en T3 con 0.62 cm, seguido de T4 con un promedio de 0.47 cm. Ambos tratamientos presentan las concentraciones más altas de citocininas (**gráfica 13**), lo cual sugiere que se necesitan mayores concentraciones a 0.5 mg/L de BA pero menores a 2 mg/L de la citocinina para obtener un mayor crecimiento, lo que indica que el desarrollo de los brotes varió en respuesta a las concentraciones de la citocinina (Da Cruz *et al.*, 2014).

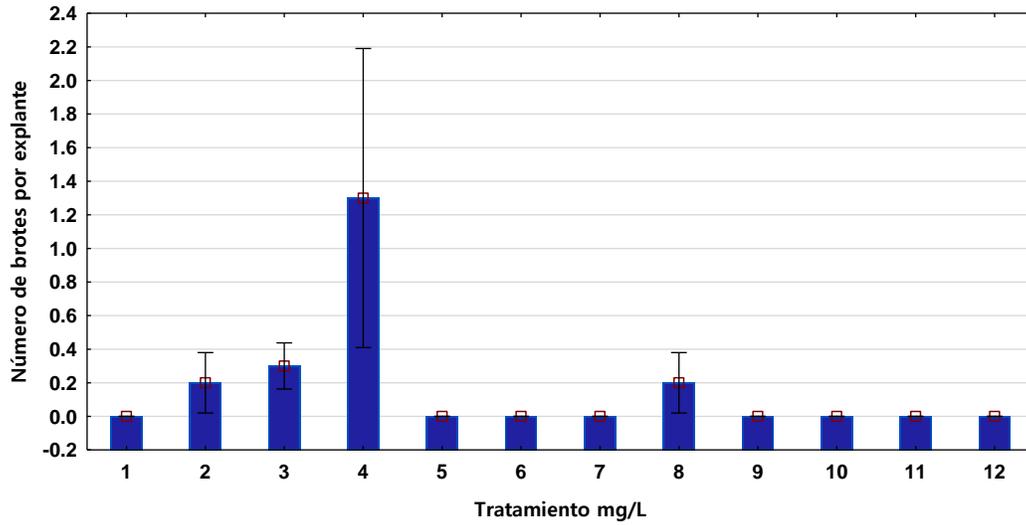
Tabla 22. Promedios y porcentajes de las diferentes respuestas desarrolladas en raíz en los diferentes tratamientos a los 60 días de inducción.

Tratamiento ANA/BA (mg/L)	Número de explantes con brotes	Número de brotes/explante ¹	Longitud del brote ² (cm)	Número de explantes con callo	Porcentaje de callo	
T1	0/0	0/10	0±0 b	0±0 b	1/10	7.5 e
T2	0/0.5	1/10	0.20±0.20 b	0.35±0.35 ab	10/10	47.5 ab
T3	0/1	3/10	0.30±0.15 b	0.62±0.36 a	8/10	32.5 bcd
T4	0/2	3/10	1.30±0.98 a	0.47±0.30 ab	9/10	32.5 cd
T5	0.5/0	0/10	0±0 b	0±0 b	9/10	25 d
T6	0.5/0.5	0/10	0±0 b	0±0 b	10/10	45 abc
T7	0.5/1	0/10	0±0 b	0±0 b	10/10	40 abcd
T8	0.5/2	1/10	0.20±0.20 b	0.24±0.24 ab	7/10	32.5 bcd
T9	1/0	0/10	0±0 b	0±0 b	10/10	55 a
T10	1/0.5	0/10	0±0 b	0±0 b	10/10	40 abcd
T11	1/1	0/10	0±0 b	0±0 b	8/10	45 abc
T12	1/2	0/10	0±0 b	0±0 b	8/10	25 d

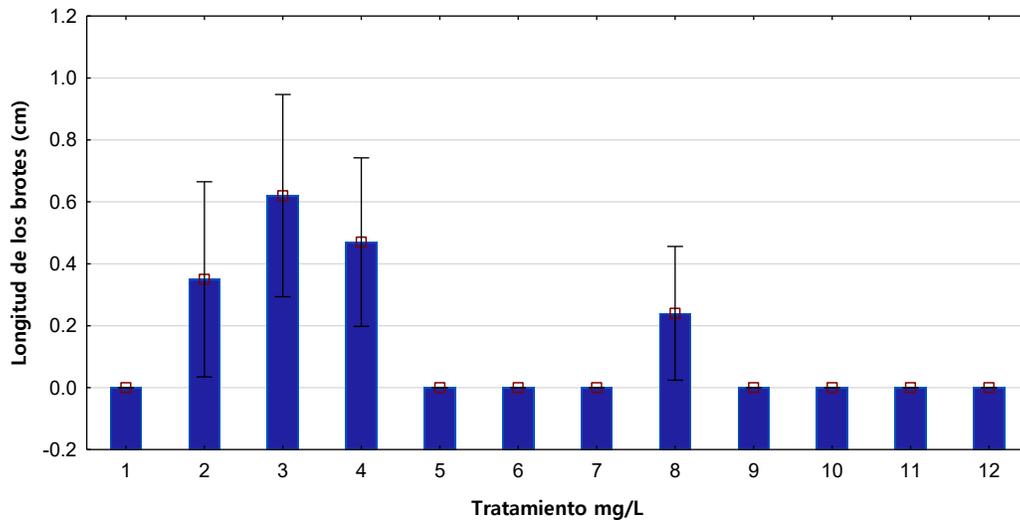
Para ¹ y ² los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), **a** representa los valores mayores y **e** a los menores.



Figura 17. Organogénesis indirecta a partir de raíz de *C. pringlei* después de 45 días de inducción. A) T2 (0.5 mg/L BA) desarrollo de un brote a partir de callo; B) T3 (1 mg/L BA) formación de un brote; C) acercamiento del brote de B); D) T3, formación de hojas en uno de los extremos del explante de raíz; E), F), G) y H) T4 (2 mg/L BA), en las cuatro imágenes se observa el desarrollo de brotes a partir de callos; I) T8 (0.5/2 mg/L ANA/BA), uno de los brotes generados en este tratamiento comenzó a desarrollar callo y no logró consolidarse en brote, el callo generado en la raíz comenzó a oxidarse.

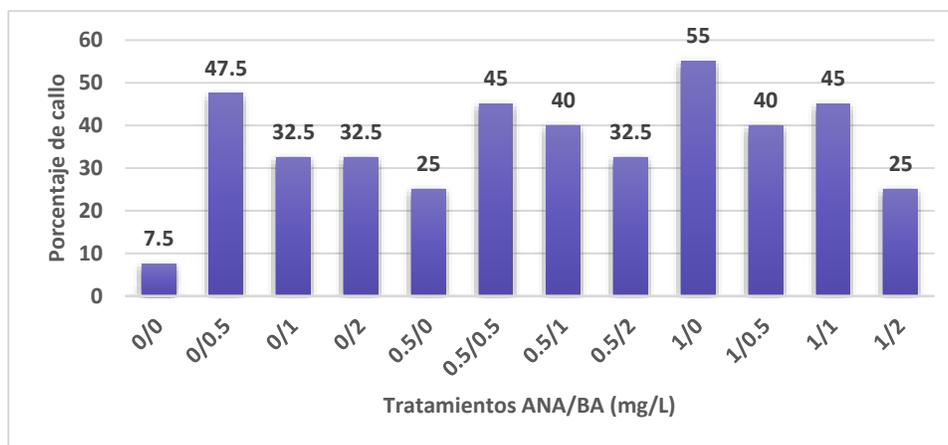


Gráfica 12. Formación de brotes *in vitro* en explantes de raíz de *C. pringlei*. Se observan los promedios obtenidos en los tratamientos 2, 3, 4 y 8. Respuesta a los 60 días de inducción.



Gráfica 13. Crecimiento de los brotes regenerados a partir de raíz de *C. pringlei*. Respuesta obtenida a los 60 días de inducción.

El 83.3% de los explantes generaron callo a los 60 días de inducción (**tabla 22**). La respuesta obtenida de los explantes de raíz, sometidos a los diferentes tratamientos, mostró diferencias en los porcentajes, pues fueron los tratamientos 2 (**figura 18A**), 6 (**figura 18C**), 9 y 11 (**figura 18G**) los que lograron la mayor formación de callo (**gráfica 14**). Los resultados anteriores indican que la auxina (T9) o la citocinina (T2) por sí mismas, fueron suficientes para promover la mayor formación de los callos y que la combinación de la auxina (ANA) y la citocinina (BA), ambas en balance (T6 y T11) también promovieron el desarrollo de callo; lo cual demuestra que, en comparación con el tratamiento control, se requiere la adición exógena de RCV para aumentar la cantidad de callo, ya que las fitohormonas endógenas, bajo la condiciones de cultivo probadas, no son suficientes para generar cantidades mayores.



Gráfica 14. Desarrollo de callo a partir de explantes de raíz de *C. pringlei* a los 60 días de inducción.

La integridad del tejido se mantuvo en los explantes, en todos los tratamientos, de esta forma, los RCV provocaron desdiferenciación del tejido cuyo crecimiento inicio principalmente a lo largo del explante, es decir, en la zona de contacto con el medio de cultivo y en los extremos de los explantes en donde se encuentra la zona de corte. Los callos formados fueron esponjosos (**figura 18H**), friables (**figura 18F**) o hiperhidratados, en los cuales varió la coloración de blanco (**figura 18A**), verde claro (**figura 18B**), marrón con tonalidades moradas (**figura 18I y J**) y café oscuro (oxidación, **figura 18D y E**), este

último, al igual que en el explante entrenudo y hoja, se desarrolló con rapidez provocando la muerte de más del 50% de los callos.

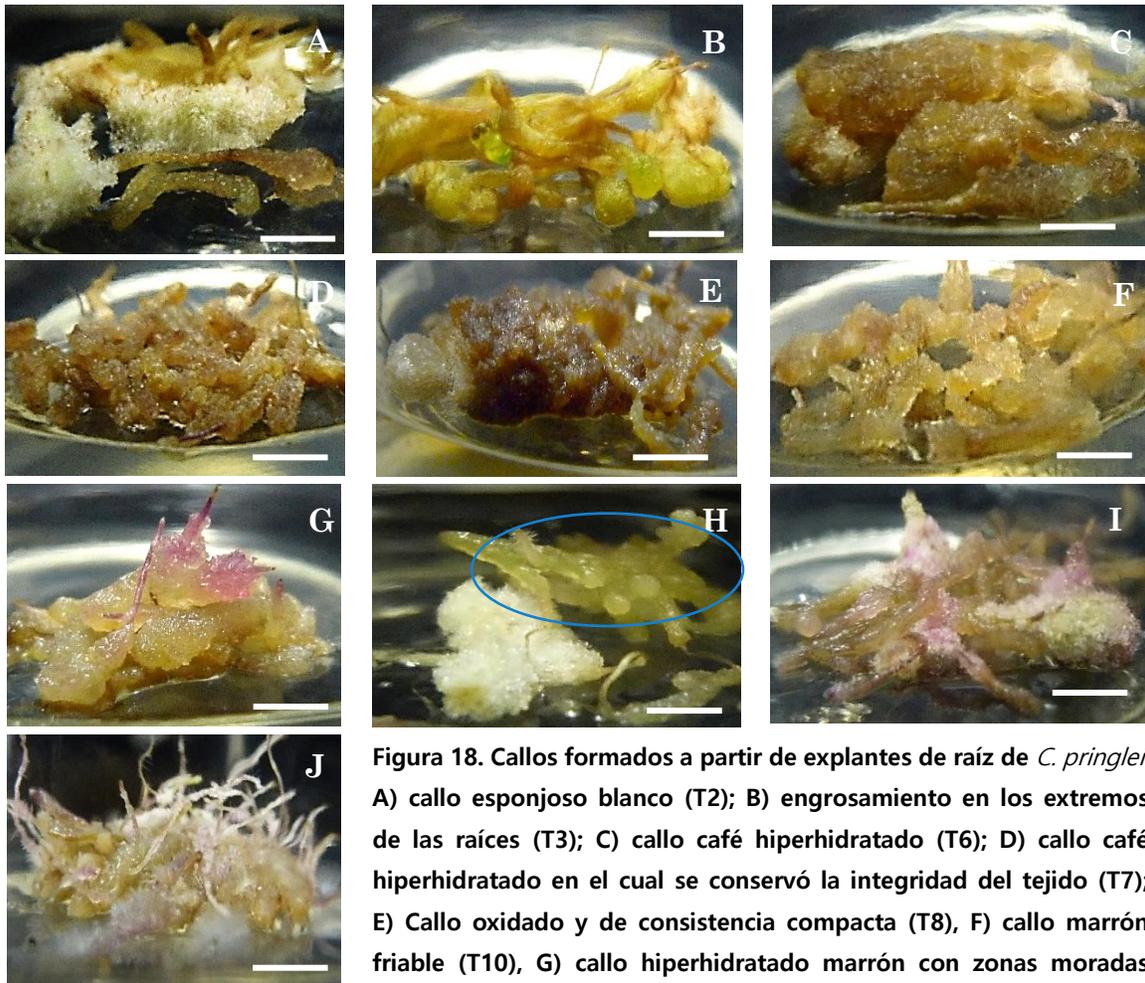


Figura 18. Callos formados a partir de explantes de raíz de *C. pringlei*. A) callo esponjoso blanco (T2); B) engrosamiento en los extremos de las raíces (T3); C) callo café hiperhidratado (T6); D) callo café hiperhidratado en el cual se conservó la integridad del tejido (T7); E) Callo oxidado y de consistencia compacta (T8), F) callo marrón friable (T10), G) callo hiperhidratado marrón con zonas moradas (T11), H) callo esponjoso blanco y zonas de tejido con engrosamiento e hiperhidratación (circulo azul, T1), I) callo esponjoso con zonas blanquecinas y moradas (T4) y J) callo marrón, blanco y con zonas moradas, friable e hiperhidratado (T5). A, B, C, D, E, F y G resultados obtenidos a los 40 días de inducción. H, I y J resultados a los 30 días de inducción. Barra: 1 cm.

El 89% de los explantes cultivados en esta etapa desarrollaron un callo que, a pesar de las características anteriormente descritas, presentaron un crecimiento limitado, ya que más del 75% de los callos se oxidaron y murieron. De esta forma, la cantidad de material disminuyó para realizar los análisis fitoquímicos; por lo consiguiente, se llevó a cabo una segunda etapa de inducción para la formación de callo en los tres tipos de explantes.

11. Segunda inducción a callo

En esta segunda inducción, se cultivaron nuevos explantes de hoja, entrenudos y raíz. La combinación de RCV se utilizó con base en los resultados obtenidos en la formación de callo en el explante raíz (1/0.5 mg/L de ANA/BA), siendo ambas concentraciones de RCV las que arrojaron los mejores resultados; sin embargo, se duplicó la concentración de la auxina resultando en el tratamiento 2/0.5 mg/L de ANA/BA para la formación de callo.

En la **tabla 23** se observa el promedio en el desarrollo de callo, arrojando una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la raíz comparada con el tallo y la hoja, lo anterior a partir de los 15 días, diferencia que se mantuvo hasta los 60 días de inducción.

Tabla 23. Promedios en la formación de los callos en los tres tipos de explantes en diferentes tiempos.

Tipo de explante	Peso inicial del explante (g)	Tiempo (días)			
		15	30	45	60
Hoja	0.22±0.02	0.11±0.01 a	0.21±0.02 a	0.31±0.03 a	0.48±0.54 a
Tallo	0.17±0.00	0.04±0.00 a	0.17±0.09 a	0.11±0.01 a	0.15±0.01 a
Raíz	0.58±0.05	0.91±0.12 b	1.61±0.28 b	1.98±0.33 b	2.69±0.45 b

Los resultados se encuentran representados como media±E.E. (error estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias dentro de una misma columna de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$), **a** representa los valores mayores y **e** a los menores.

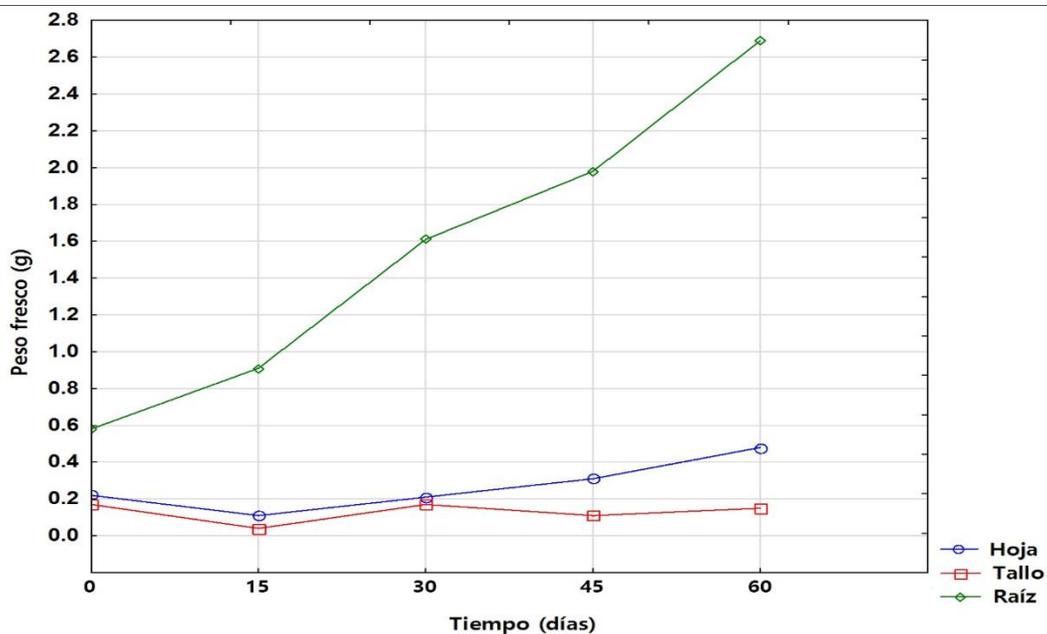
Como se observa en la **gráfica 15**, existe una diferencia apreciable en la producción de biomasa en relación al explante. Es importante hacer notar que los tres tipos de explantes permanecieron únicamente 60 días en medio de inducción, ya que en éstos comenzó a aumentar el proceso de oxidación.

En la hoja y el tallo, la curva arrojó comportamientos similares (**gráfica 15**); sin embargo, el promedio, a lo largo del tiempo analizado, varió a los 15 y 60 días de inducción (**tabla 23**). La hoja presentó fluctuaciones a lo largo de 45 días, lo cual pudo deberse a que la hoja y posteriormente las células (callo), se estaban adaptando a las condiciones nutricionales en esta etapa (fase lag o de reposo) (Pérez *et al.*, 1999) y que la disminución en el peso fresco se debió a la pérdida de agua de la célula (Hernández 1998, Herrera 2001). Entre los 45 y 60 días de inducción comenzó la fase exponencial, en donde la hoja aumentó su biomasa obteniendo un promedio de 0.48 g.

El tallo también presentó fluctuaciones a lo largo de la etapa de inducción. El promedio más bajo se observó a los 15 días (0.04 g), lo cual pudo deberse a las mismas condiciones de cultivo que la hoja. Después de 15 días, las diferencias en los promedios (pesos) no fueron significativas y al término de la etapa de inducción (60 días), el peso de la biomasa no aumentó (**tabla 23**), determinando que, bajo las condiciones de cultivo aplicadas en este experimento, el tallo no es buen explante para obtener una mayor cantidad de callo al permanecer por un largo periodo en la fase de reposo.

Por el contrario, los datos obtenidos en los explantes de raíz, arrojaron un crecimiento exponencial a lo largo del tiempo de inducción (**gráfica 15**), sin presentar una fase lag o de reposo que muestre un periodo de adaptación al medio de cultivo (Hernández, 1998). Lo anterior podría determinarse, reduciendo el tiempo de la toma del peso fresco. Al final de la etapa de inducción (60 días), el callo producido alcanzó un promedio en peso de 2.69 g.

La diferencia en el peso entre los tres tipos de explantes puede estar relacionado con el tamaño del explante, ya que para hoja y raíz se tomó un tamaño de 1 cm² y para entrenudo 1 cm de longitud, variando así el peso inicial, arrojando que los resultados obtenidos a partir de cualquier tipo de explante pueden variar, inclusive entre genotipos estrechamente relacionados (George *et al.*, 2008). Otro tipo de respuesta presente en algunos de los explantes fue el desarrollo de raíces adventicias en las zonas de corte o en la vena media en el caso de hoja (**figura 19**).



Gráfica 15. Curvas de crecimiento para los callos obtenidos en los tres tipos de explantes de *C. pringlei*.



Figura 19. Desarrollo de raíces adventicias en: A) raíces, las nuevas raíces se observan de color blanco (flechas), B) entrenado, el crecimiento de raíces se observa en un extremo del explante (zona de corte), C) hoja, desarrollo de raíces en zona de corte (flecha blanca) y a partir de callo desarrollado en el centro de la hoja (flecha azul). Resultados obtenidos a los 45 días de inducción. Barra: 5 mm.

En los tres tipos de explantes, los reguladores de crecimiento promovieron la división celular, la formación y el crecimiento de células indiferenciadas. El callo desarrollado en esta etapa, varió de esponjoso, friable y en algunos explantes se observó compacto. La coloración se presentó de hialino, blanco, verde y en su mayoría marrón (**figura 20**).

La aplicación de los tres tipos de antioxidantes tuvo un efecto muy marcado en la sobrevivencia de los callos en comparación con el obtenido en la primera inducción. El aumento en la concentración del antioxidante Polivinilpirrolidona PVP (3 g/L), adicionado al medio de cultivo, y realizar los cortes de los explantes bajo inmersión en una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico (150 mg/L de cada uno), inhibieron o disminuyeron la oxidación de los callos evitando la reacción en cascada de los radicales libre (Azofeita, 2009). Se desarrolló una coloración marrón (**figura 20C y D**) en más del 60% de los callos; sin embargo, esta respuesta no fue letal.

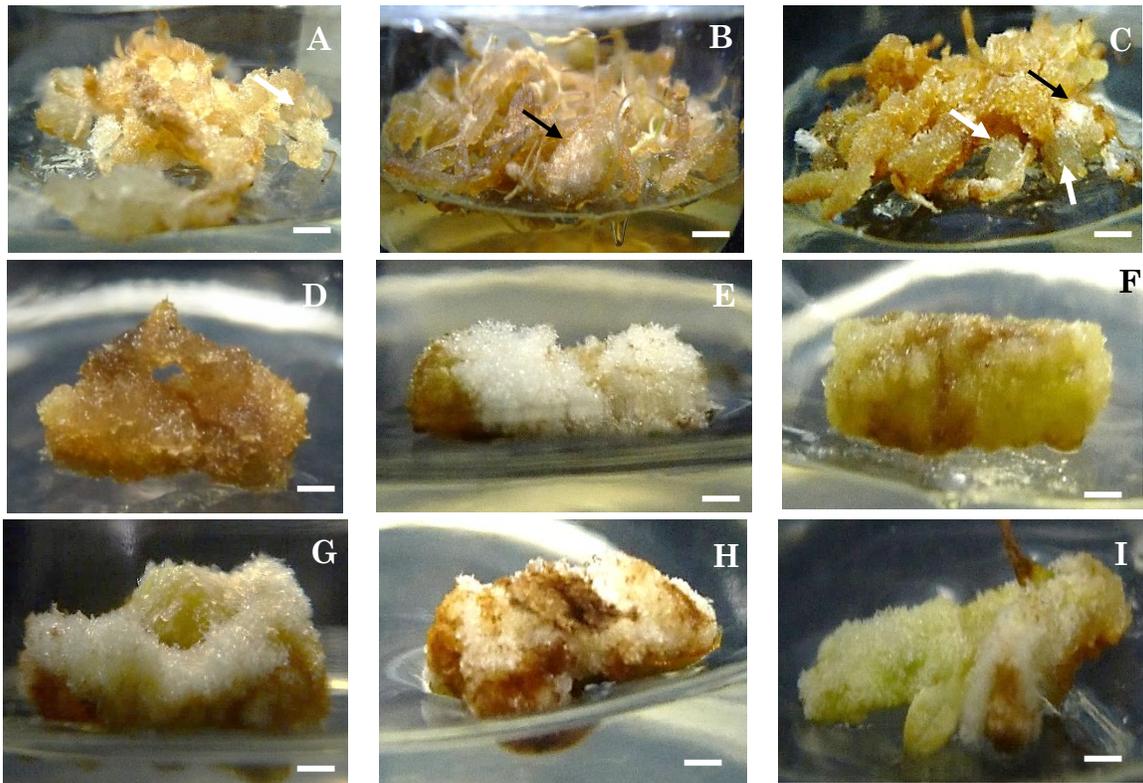


Figura 20. Callos provenientes del tratamiento 2/0.5 mg/L de ANA/BA en los diferentes tipos de explantes. A, B y C) a partir de raíces, la coloración del callo se observó de marrón (A) a café (B y C), coloración común en este tipo de explante; sin embargo, se presentaron zonas hialinas (A y C, flechas blancas) y pocas zonas blanquecinas (B y C, flechas negras), la consistencia, en la mayoría de los explantes de este tipo fue friable. D, E y F) a partir de entrenudos, la coloración varió de café (D), blanco (E) y verde (F), la consistencia del callo fue friable e hiperhidratado (D), esponjoso (E) y compacto (F). G, H e I) a partir de hojas, la coloración del callo fue blanca (G), café (H) y verde (I), la consistencia del callo fue principalmente esponjosa (G, I) y compacta (H). Resultados obtenidos a los 45 días de inducción. Barra 5 mm.

12. Evaluación del efecto del carbón activado (CA) sobre la formación de raíces en brotes

La raíz emergió a los 20 días de cultivo (**tabla 24**); sin embargo, únicamente se desarrolló una raíz en un sólo brote en cada uno de los tratamientos. El tiempo necesario para la regeneración de raíces coincide con la respuesta obtenida en las regiones apicales en este mismo trabajo, en donde ocurrió de manera espontánea en los tratamientos control a partir de los 20 días de cultivo (datos no presentados).

La respuesta obtenida anteriormente, se conservó hasta el término de la etapa de enraizamiento (35 días de cultivo), es decir, no se observó la generación de más raíces en el resto de los brotes; sin embargo, la longitud de las raíces obtenidas fue mayor al término de esta etapa. Como se observa en la **tabla 24**, las raíces, después de emerger, continuaron su desarrollo hasta después de los 28 días de cultivo, mostrando mayores longitudes a los 35 días, con 6.4 cm en el T1 y 6 cm en el T2.

Durante los diferentes cultivos realizados en esta investigación, se observó la formación de raíces; no obstante, para *C. pringlei*, el uso de CA no aceleró ni aumentó el número de raíces generadas; así como la longitud de las mismas, en comparación con el tratamiento control (T1).

Tabla 24. Promedio de la formación de raíces en brotes a los 21, 28 y 35 días de cultivo.

Tratamiento	Tiempo					
	21 días		28 días		35 días	
	no. raíces	longitud	no. raíces	longitud	no. raíces	longitud
Control (T1)	1	0.1 mm	1	0.1 mm	1	6.4 cm
CA (T2)	1	3.2 cm	1	3.2 cm	1	6 cm

Debido a los trabajos de Skoog y Miller (1957) se sabe que cuando al medio de cultivo se añaden concentraciones relativamente altas de auxinas y concentraciones bajas o nulas de citocininas se favorece la formación de raíces. Por esta razón, en la mayoría de los trabajos de micropropagación se reporta el uso de auxinas para inducir el enraizamiento de los brotes; por ejemplo, *Artemisia vulgaris* L. (Sujatha y Kumari, 2012) y *Coreopsis lanceolata* (Lee *et al.*, 1994), ambas especies pertenecientes a la familia Asteraceae.

Sin embargo, George y Sherrington (1984) mencionan que algunas especies sólo necesitan que los brotes se transfieran a un medio libre de fitohormonas o RCV para inducir la rizogénesis. Vilma (2010) menciona que la formación de raíces adventicias es relativamente fácil de conseguir en plantas herbáceas, como es el caso de *C. pringlei*, donde la aparición y desarrollo de las raíces ocurrió de manera espontánea en los brotes provenientes de regiones apicales, así como de brotes regenerados. En este sentido Vanegas y colaboradores (2002) lograron que los brotes de *Tagetes erecta* se elongaran y desarrollaran raíces normales al colocarlos en medio MS libre de reguladores de crecimiento, de igual forma, Chae (2014) demostró que la selección del medio de cultivo, sin la adición de RCV fue esencial para mejorar la regeneración de raíces *in vitro* y la micropropagación de *Chrysanthemum morifolium*, encontrando que el mejor medio de cultivo para la regeneración y crecimiento de la raíz fue el SH a la mitad de su concentración.

Por otro lado, existen otras variables que están involucradas en la rizogénesis, un ejemplo de estas variables es el CA, Thomas (2008) menciona que, además de sus propiedades antioxidantes, suele utilizarse en el cultivo *in vitro* debido a que, solo o en combinación con auxinas, induce la formación de raíces en los brotes micropropagados. El oscurecimiento del medio reduce la luz en la base del brote y provee un ambiente que favorece la acumulación de auxinas fotosensibles para el enraizamiento (Pan y van

Staden, 1998). El cultivo de brotes de *Dahlia imperialis* y *D. excelsa* en donde se adicionó carbón activado se generaron las raíces, pero en el doble de tiempo en el que se presentó para aquellos tratamientos con AIA (González, 1999).

Una de las respuestas no deseadas durante la individualización de los brotes es la formación de callo, el cual se observó en dos de los brotes en el T1, posteriormente, en uno de los brotes se observó el desarrollo de una raíz (**figura 21A y B**). Por el contrario, en el T2, el desarrollo de la raíz fue de forma directa (**figura 21C**), es decir, el carbón activado disminuyó o evitó considerablemente la producción de callo en la base del explante (Thomas, 2008).

La morfología y coloración de las raíces generadas en los brotes, varió de acuerdo al tratamiento probado. En el T1, durante el crecimiento de la raíz, la coloración de ésta comenzó a observarse de color blanco, principalmente en la zona apical, conforme aumentaba la longitud se tornaba de color verde claro (zona media) y en la zona madura en color se tornaba café claro con zonas rojizas (**figura 21B**). En este tratamiento, la raíz se regeneró mediante organogénesis indirecta. También es importante indicar que no presentó ramificaciones. En el tratamiento con carbón activado, la coloración de la raíz fue de un verde claro, en donde la zona de crecimiento; es decir, en donde se encuentra la zona apical, la coloración permaneció blanca. La raíz se regeneró mediante la vía directa y presentó gran cantidad de ramificaciones (**figura 21D**).

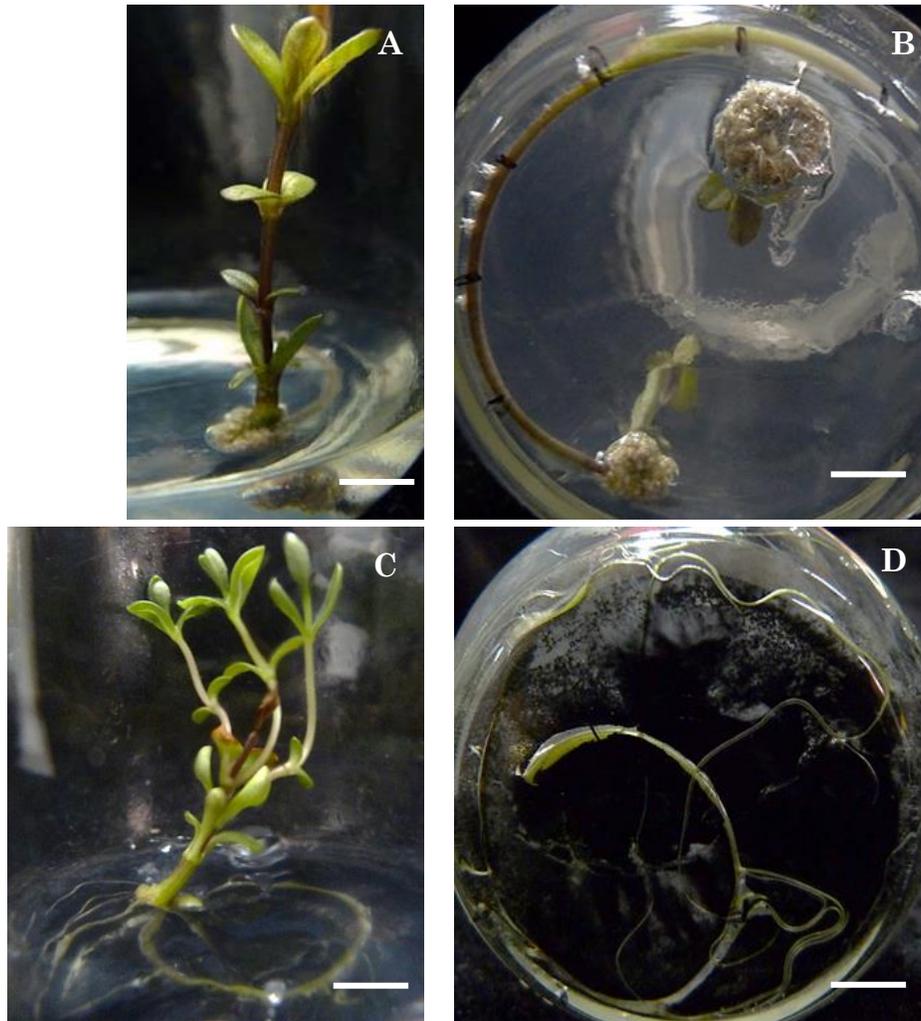


Figura 21. Brotes de *C. pringlei* sometidos a dos tratamientos para la evaluación de la regeneración de raíz después de 35 días de inducción (A y C). A y B) T1; C y D) T2. Al término del tiempo de inducción, las raíces de ambos tratamientos presentaron la misma longitud; sin embargo, la raíz (D) del T2 presentó ramificaciones (raíces secundarias) y no así la raíz (B) del T1. Barra: 1 cm.

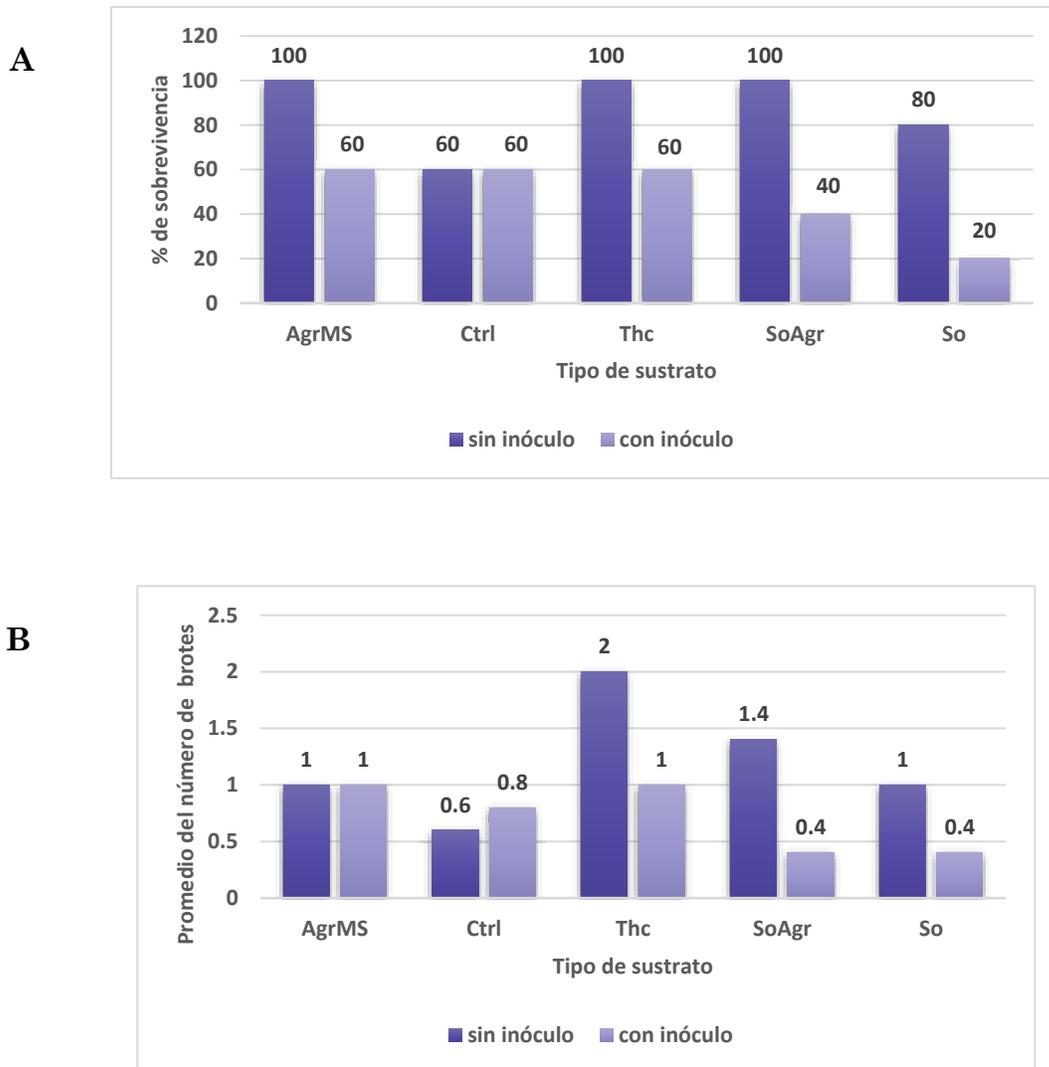
13. Aclimatización

a. Evaluación del establecimiento de plántulas en sustratos in vitro

Se observaron diferencias contrastantes en la sobrevivencia de las plántulas en ambos lotes, es decir, en los lotes con inóculo y sin éste. En los tratamientos sin inóculo, los sustratos con AgrMS, Thc y SoAgr obtuvieron una sobrevivencia del 100% (**figura 22C, I y F respectivamente**), seguido del tratamiento So con el 80% (**figura 22K**) y por último el control con el 60% (**figura 22M**). Por el contrario, los tratamientos a los que se les adicionó el inóculo presentaron una sobrevivencia menor al 60% (AgrMS, control y Thc), el SoAgr con 40% y el So con el menor porcentaje de sobrevivencia con el 20% de las plántulas (**gráfica 16A**), lo anterior a los 34 días de siembra.

Lo anterior se puede atribuir a varios factores. La micorriza comercial utilizada no sufrió un proceso de esterilización al ser adicionada a los sustratos provocando contaminación y posteriormente la muerte de las plántulas ya que éstas, al provenir de cultivos *asépticos*, son vulnerables (**figura 22B, H y J**). Por otro lado, se ha visto que existe una influencia del sustrato en el desarrollo de la colonización micorrízica (Vetsberg, 1992). Esto se debe a que, durante su esterilización, se producen y/o liberan elementos tóxicos que pueden afectar la simbiosis; así como modificaciones en el pH que repercuten en la asimilación de los nutrimentos (Ortega, 1996). Además, también se deben considerar las modificaciones de la raíz que podrían impedir su establecimiento. Muchas veces las raíces generadas en los medios *in vitro*, no son funcionales y pueden ser quebradizas y fisiológicamente incapacitadas para llevar a cabo una absorción normal (Barea *et al.*, 1992).

En cuanto al número de brotes, los mismos sustratos que presentaron los mayores porcentajes de sobrevivencia (sin inóculo), fueron los que presentaron los promedios más altos, con la adición del suelo original (So) que obtuvo el mismo valor que el sustrato AgrMS a los 34 días de siembra (**gráfica 16B, figura 22C, F, G e I**).



Gráfica 16. Gráficas que muestran el porcentaje de sobrevivencia (A) y el promedio del número de brotes (B) de plántulas de *C. pringlei* durante el establecimiento en sustratos *in vitro*. Datos a los 34 días de siembra.

En la **tabla 25** se muestran los promedios obtenidos en el número de brotes generados a los 15 y 34 días de siembra. Se muestra que las plántulas a las que no se les adicionó el inóculo, desarrollaron mayor número de brotes a los 15 días de cultivo. Por el contrario, las plántulas con inóculo, arrojaron promedios bajos (0.6 y 0.8 dependiendo del sustrato, **gráfica 16B**) exceptuando el tratamiento Thc el cual obtuvo el mayor e igual promedio en ambos lotes.

A los 34 días de siembra, el promedio disminuyó en todos los tratamientos sin inóculo exceptuando el Thc que mantuvo el mismo promedio a lo largo del tiempo. El número de brotes, en los sustratos con inóculo, también disminuyó en 3 tipos de suelo (So, SoAgr y Thc), sin embargo, este último aún siguió conservando uno de los promedios más altos acompañado por el sustrato AgrMS. El control mantuvo el mismo promedio a lo largo de todo el experimento (**tabla 25**).

Tabla 25. Promedio del número de brotes desarrollados en los diferentes tipos de sustratos, así como en la presencia del inóculo o sin éste. Los datos se muestran a los 15 y 34 días de siembra.

Tratamiento	Tiempo			
	15 días		34 días	
	sin inóculo	con inóculo	sin inóculo	con inóculo
AgrMS	1.4	0.8	1.0	1.0
Control	1.0	0.8	0.6	0.8
Thc	2.0	2.0	2.0	1.0
SoAgr	1.8	0.6	1.4	0.4
So	1.6	0.8	1.0	0.4

La disminución en el número de brotes, al término de los 34 días, se debió a la apariencia necrosada que se desarrolló en éstos causándoles la muerte, lo cual se puede atribuir a un efecto de toxicidad por la liberación de sustancias nocivas de los sustratos al ser esterilizados, cambian su composición mineral y puede acidificar el cultivo (Ortega, 1996). Lo anterior se observó principalmente en los sustratos SoAgr y So (**figura 22D, F**

y J), al presentar los promedios más bajos, ambos sustratos originarios (So) de la Sierra Tarahumara, en donde crece *C. pringlei*, el cual se trata de un sustrato no seleccionado para cultivo. En el tratamiento control no varió el promedio de los brotes a lo largo del tiempo, Douglas y colaboradores (1989) consideran que el gelificante como un sustrato no favorece la micorrización, por producir una falta de aireación necesaria para dicha simbiosis. Por otro lado, el inóculo utilizado no se desinfectó, lo cual llevó a la contaminación del sustrato y por lo consiguiente a muerte de los brotes.

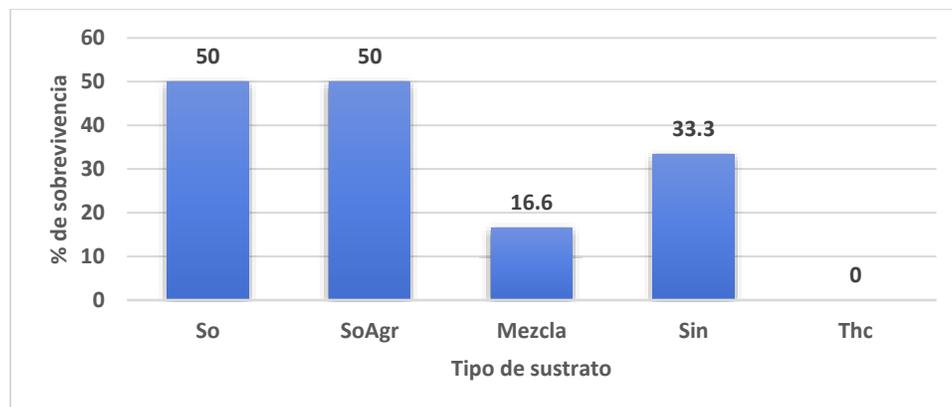
Morte y Honrubia (1996) mencionan que la micorrización *in vitro* permite controlar las condiciones óptimas de crecimiento y simbiosis de las especies vegetales y fúngicas, así como seleccionar las cepas de hongos y explantes del vegetal más adecuadas a unas condiciones de cultivo en campo determinadas. Sin embargo, estudios previos realizados por Morte y colaboradores (1994) para la micorrización *in vitro* entre plantas propagadas de *Helianthemum almeriense* y *Terfezia claveryi* (trufa del desierto), en medio MMN modificado (Modified Melin-Norkrans), aunque obtuvieron un elevado porcentaje de micorrización, la mayoría de las plántulas se necrosaron y no sobrevivieron *in vitro*. Esto fue debido al medio de cultivo utilizado, el cual no proporciono los requerimientos nutricionales necesarios para la planta.

La utilización de los sustratos *in vitro*, así como la micorrización en las últimas etapas de la micropropagación, ayudaría a las plantas a adaptarse mejor a las condiciones *ex vitro*, así como asegurar la salida de las plántulas perfectamente micorrizadas (Morte y Honrubia, 1996). Existen trabajos, con diferentes especies vegetales micropropagadas y fúngicas, que describen la micorrización *in vitro* en sustratos como perlita embebida de solución nutritiva donde creció previamente el hongo (Rancillac, 1982) o una mezcla de perlita y turba humedecida con solución nutritiva MMN (Modified Melin-Norkrans) (Marx, 1969).

En general, las plántulas presentaron tallos largos, de color verde o rojizo, que alcanzaban longitudes de 10 a 12 cm, lo cual llevaba al tallo a enroscarse a la altura de la tapa del frasco. La oxidación o marchitamiento ocurría en el tallo principal o en la yema apical, activando las yemas preformadas para dar origen a los brotes, condición que comenzó a observarse a los 7 días de siembra.

b. Evaluación del establecimiento de plántulas a condiciones *ex vitro*

La sobrevivencia de las plántulas no sobrepasó el 50% y como se observa en la **gráfica 17**, dependiendo del tipo de sustrato dependió el porcentaje de sobrevivencia. Los suelos que presentaron los mejores resultados fueron el suelo original (So) y el suelo original: agrolita (SoAgr), con el 50% cada uno. Seguidos del suelo con inóculo (Sin) con el 33.3%, posteriormente la Mezcla con el 16.6% y, por último, el suelo de tierra de hoja con corteza (Thc) con la muerte del 100% de los individuos.



Gráfica 17. Porcentajes de sobrevivencia de las plántulas de *C. pringlei*, en los diferentes tipos de suelos. Datos tomados a los 42 días de siembra.

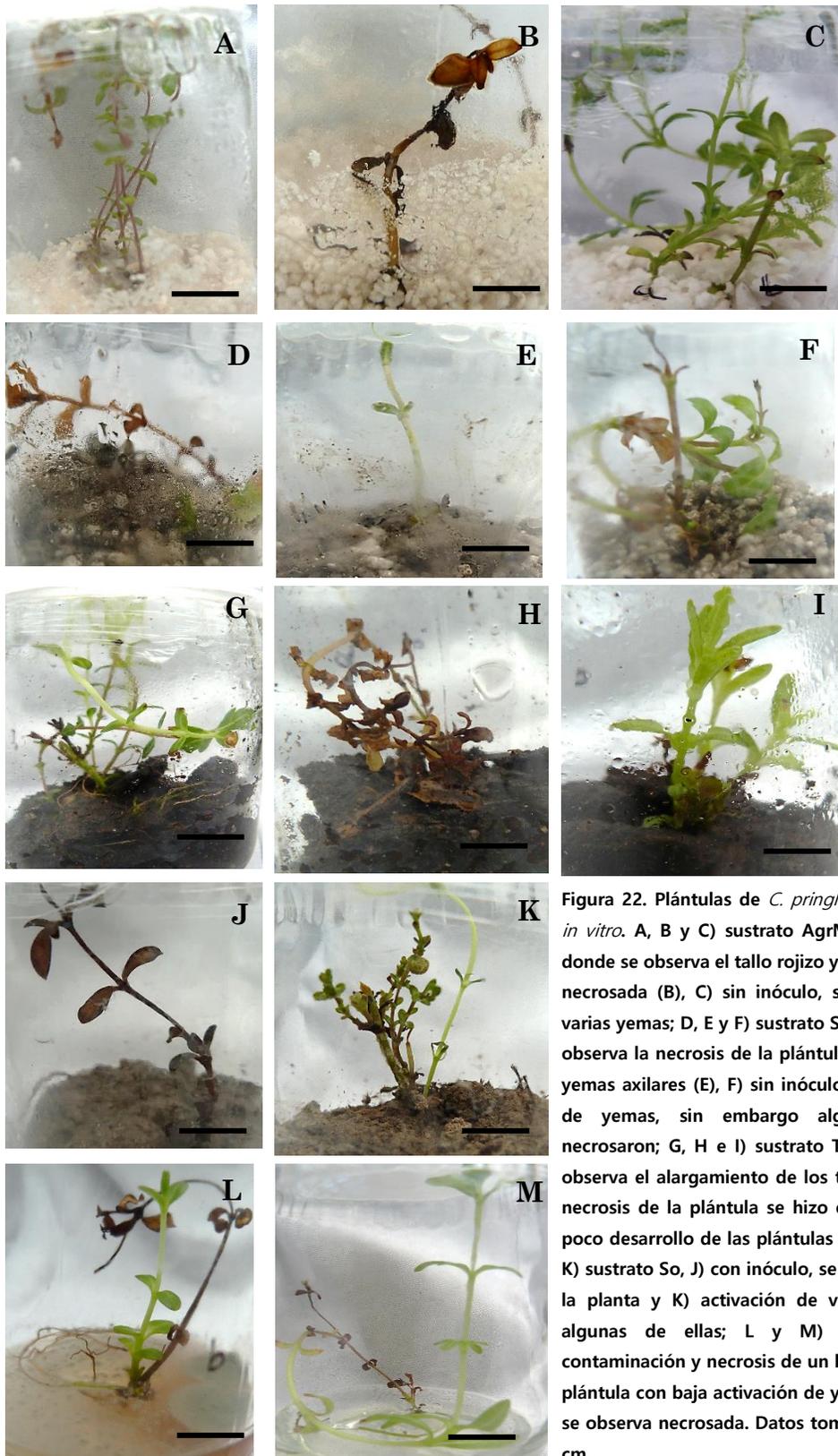


Figura 22. Plántulas de *C. pringlei* establecidas en sustratos *in vitro*. A, B y C) sustrato AgrMS, A y B) con inóculo, en donde se observa el tallo rojizo y el ápice (A) o toda la planta necrosada (B), C) sin inóculo, se observa la activación de varias yemas; D, E y F) sustrato SoAgr, D y E) con inóculo, se observa la necrosis de la plántula (D) y la nula presencia de yemas axilares (E), F) sin inóculo, se observa el crecimiento de yemas, sin embargo algunas zonas apicales se necrosaron; G, H e I) sustrato Thc, G y H) con inóculo, se observa el alargamiento de los tallos y de las yemas (G), la necrosis de la plántula se hizo evidente (H), I) sin inóculo, poco desarrollo de las plántulas y crecimiento de yemas; J y K) sustrato So, J) con inóculo, se observa la necrosis de toda la planta y K) activación de varias yemas y necrosis en algunas de ellas; L y M) control, L) con inóculo, contaminación y necrosis de un brote, y M) elongación de la plántula con baja activación de yemas, la base de la plántula se observa necrosada. Datos tomados a los 24 días. Barra: 1 cm.

La muerte de las plántulas ocurrió principalmente por el marchitamiento, a pesar del riego cada tercer día y la cubierta plástica colocada en cada una de las macetas. Lo anterior se puede atribuir al cambio de humedad atmosférica y el tipo de suelo, que pudieron ser el detonante para la muerte del 70% de las plántulas a pesar de que ya estaban acondicionadas a la luz natural y contaban con 30 días en el invernadero dentro de los frascos con los suelos *in vitro*.

Los resultados anteriores hacen evidente las características anatómicas y fisiológicas de las plantas micropropagadas, las cuales ocasionan que una gran parte de ellas no sobrevivan al cambio de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, en la que las plantas pierden agua rápidamente debido a que los estomas son inicialmente incapaces de evitar la transpiración de las plantas, contribuyendo así al marchitamiento de éstas (Pospíšilová *et al.*, 1999).

Con respecto al tipo de suelo, los sustratos provenientes de Chihuahua (So, SoAgr y Sin) fueron los que presentaron los mayores porcentajes de sobrevivencia (**figura 23A y C**). Es importante hacer notar que estos sustratos no sufrieron el proceso de esterilización, con lo cual, se puede pronosticar que las plántulas micropropagadas podrían tener una alta probabilidad de establecerse y adaptarse a suelos naturales procedentes de su edafocosistema nativo (Ortega, 1996), resultados importantes que podrían ser un paso para estudios de reintroducción.

La muerte de las plántulas en la mezcla y en el suelo Thc (**gráfica 17**) puede deberse al marchitamiento de las plántulas. Los sustratos como la tierra de hoja, *Sphagnum* sp, agrolita y la corteza, componentes de estos dos tipos de suelo, tienen alta capacidad de retener agua, lo cual ha permitido su uso en la aclimatización en las plantas micropropagadas que son susceptibles a los cambios bruscos en la humedad del ambiente.

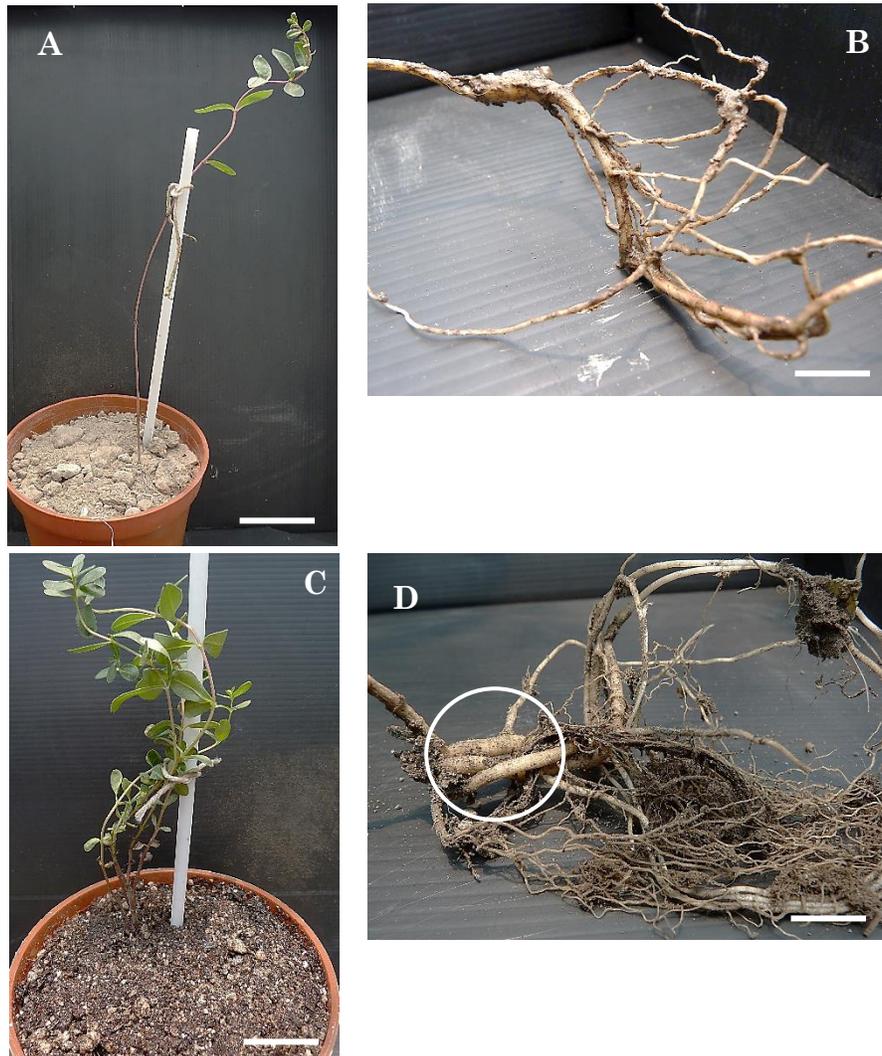


Figura 23. Ejemplares aclimatizados. A y B) sustrato So, tallo alargado de color rojizo (A) y raíz con un eje principal y el desarrollo de varias raíces secundarias (B); C y D) sustrato Sin, el desarrollo de brotación múltiple es evidente y la coloración del tallo verde-rojiza claro (C) y en D) engrosamiento de la raíz lo cual puede dar origen a la raíz tuberosa (círculo blanco) típica en *C. pringlei*, posteriormente el desarrollo del eje primario del cual se originan las raíces secundarias abundantes en este individuo. Datos obtenidos después de 6 meses. Barra: 1 cm.

B. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

1. Análisis químico

a. Obtención de extractos y fracciones

Los extractos se obtuvieron mediante un proceso de maceración empleando una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH (1:1). Una vez obtenidos se filtraron y concentraron a sequedad al vacío. Los pesos y porcentajes de rendimiento se muestran en la **tabla 26**.

Tabla 26. Rendimientos de los extractos orgánicos de *C. pringlei* para el análisis fitoquímico.

Clave	<i>Cosmos pringlei</i>	Peso seco (g)	Peso extracto (g)	% de rendimiento
EO	Raíces recolectadas de campo	1800	312.51	17.36
Rpa	Partes aéreas (<i>in vitro</i>)	1.64	0.202	12.31
Rr	Raíces (<i>in vitro</i>)	0.814	0.107	13.14
Ch	Callos de hoja (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)	2.66	0.261	9.81
Ct	Callos de tallo (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)	2.65	0.569	21.47
Cr	Callos de raíz (ANA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L)	2.10	0.324	15.42

La cromatografía en columna (CC) se realizó únicamente para el extracto de las raíces tuberosas provenientes del campo, con la finalidad de obtener los constituyentes bioactivos de *C. pringlei*, previamente descritos por Cuevas (1997) y Rivero (2000).

Se realizó el fraccionamiento por CC, usando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó un total de 28 fracciones primarias (**tabla 27**).

La consistencia de las fracciones fue desde la aceitosa de color amarillo transparente (menos polares) hasta viscosa de color maple (más polares). En muchas

fracciones se observó la precipitación de un polvo fino de color blanco a crema y en otras se observó la presencia de cristales filamentosos (son los más abundantes) y cristales en forma de rombos pequeños.

Tabla 27. Fracciones reunidas por CCF obtenidas del extracto obtenido de raíz tuberosa de *C. pringlei*.

Fracción	Clave	Fracción	Clave	Fracción	Clave	Fracción	Clave
1-7	F1	22-24	F8	53-58	F15	85	F22
8	F2	25-28	F9	59-63	F16	86	F23
9-10	F3	29-32	F10	64-71	F17	87-89	F24
11	F4	33-40	F11	72-77	F18	90	F25
12-13	F5	41-45	F12	78-80	F19	91-92	F26
14-18	F6	46-49	F13	81-83	F20	93-95	F27
19-21	F7	50-52	F14	84	F21	96	F28

De la fracción primaria F3 (**tabla 27**), cristalizó de manera espontánea un sólido cristalino incoloro y el remanente de esta fracción fue un aceite amarillo.



Figura 24. Cromatografía de las fracciones F3 y F4. Placa desarrollada con el sistema de elución Hex:AcOEt (8:2)

Al realizar la placa cromatográfica de las fracciones F3 (9-10) y F4 (11), y al ser revelada con sulfato cérico (**figura 24**), se observó la presencia de una mancha color violeta muy abundante, que también se detectó en el extracto orgánico (EO). Posteriormente, la cromatografía comparativa del EO con las cuatro lactonas sesquiterpénicas utilizadas como referencias, permitió la identificación de la deshidrocostuslactona, compuesto también detectado en las fracciones F3 y F4.

b. Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos.

El análisis por CCF de los tres tipos de callo, de las partes aéreas y de los regenerantes de raíz no reveló la presencia de lactonas sesquiterpénicas (costunólida, deshidrocostuslactona, 15-isovaleriloxi costunólida, 15-isovaleriloxi costunólida + 15-isobutiriloxi costunólida) utilizados como referencias, en las dos longitudes de onda analizadas (**figura 25A y B**)

La ausencia de las lactonas sesquiterpénicas en los callos (Ch, Ct y Cr), partes aéreas (Rpa) y regenerantes de raíz (Rr) de *C. pringlei*, puede deberse a que las condiciones *in vitro* no fueron las adecuadas para inducir su biosíntesis. Existen evidencias de que los metabolitos secundarios (ms) se encuentran bajo una estricta regulación metabólica y su síntesis está regulada también por factores como la luz, los reguladores de crecimiento y la temperatura (Roca y Mroginski, 1991), factores estrictamente controlados en los cultivos *in vitro* y no así en el ambiente natural. De esta forma, no todos los compuestos son producidos en igual cantidad, disminuyendo la concentración en los extractos. Además, puede darse cierta inestabilidad genética y fisiológica y observarse una pérdida del producto en el tiempo (Sharry *et al.*, 2015).

Por otro lado, es notorio observar en las placas cromatográficas, principalmente en la revelada con sulfato cérico (**figura 26**), la diversidad y cantidad de compuesto que se desarrollaron en los tres tipos de extractos (callos, regenerantes partes aéreas y raíz regenerada) y en el EO. Esto evidencia que bajo las condiciones *in vitro* probadas en este estudio, se sintetizaron diversos tipos de compuestos independientemente del tipo de tejido que se haya tomado.

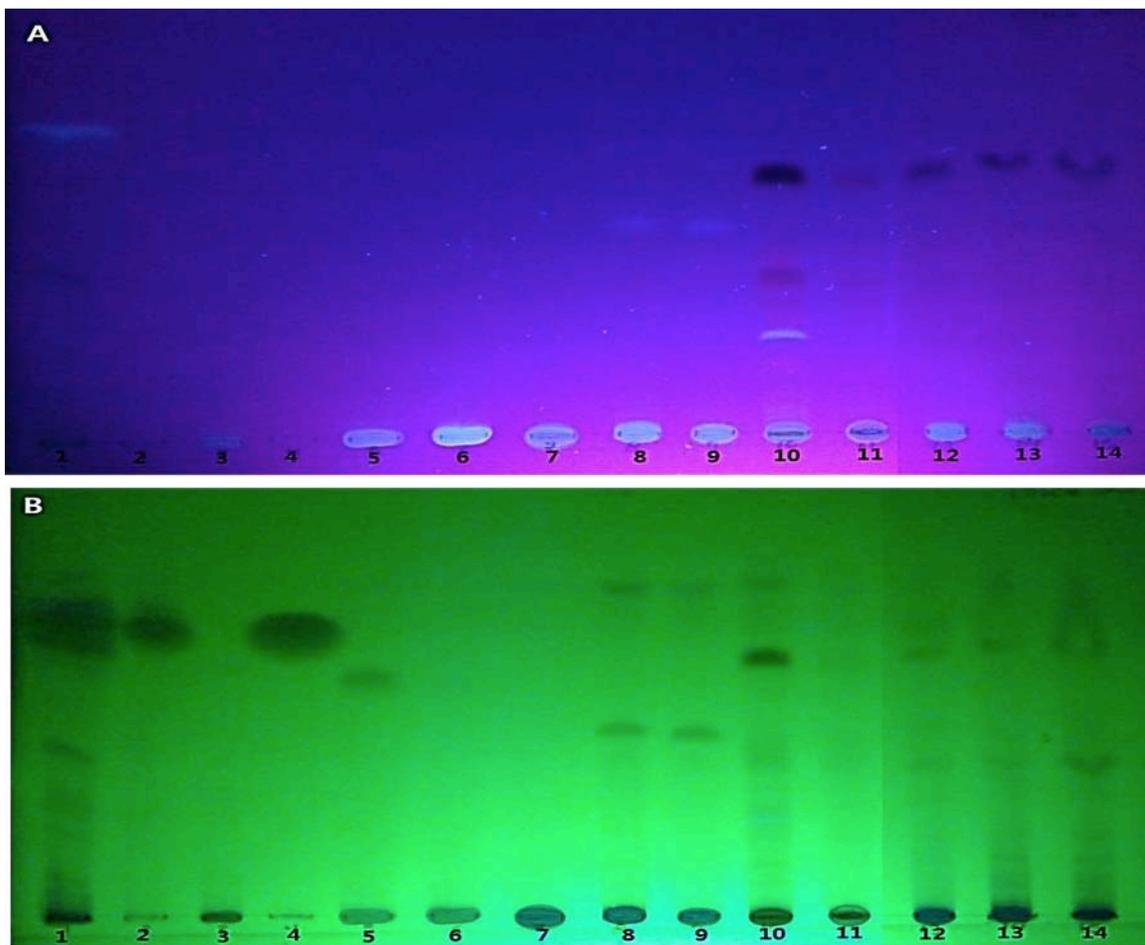


Figura 25. CCF de los extractos provenientes de cultivos *in vitro* de *C. pringlei*. A) Placa observada bajo luz UV ($\lambda=365$ nm) y B) Placa observada bajo luz UV ($\lambda=254$ nm). 1: extracto orgánico, 2: Fracción F3, 3: costunólida, 4: deshidrocostuslactona, 5. 15-isovaleriloxi costunólida, 6: 15-isovaleriloxi costunólida + 15-isobutiriloxi costunólida, 7: callo de hoja, 8: callo de raíz, 9: callo de tallo, 10: regenerantes de partes aéreas, 11: raíces regeneradas, 12: callo de tallo, 13: callo de raíz y 14: callo de hoja. Placa desarrollada con el sistema de elución CH_2Cl_2 : MeOH (99:1)

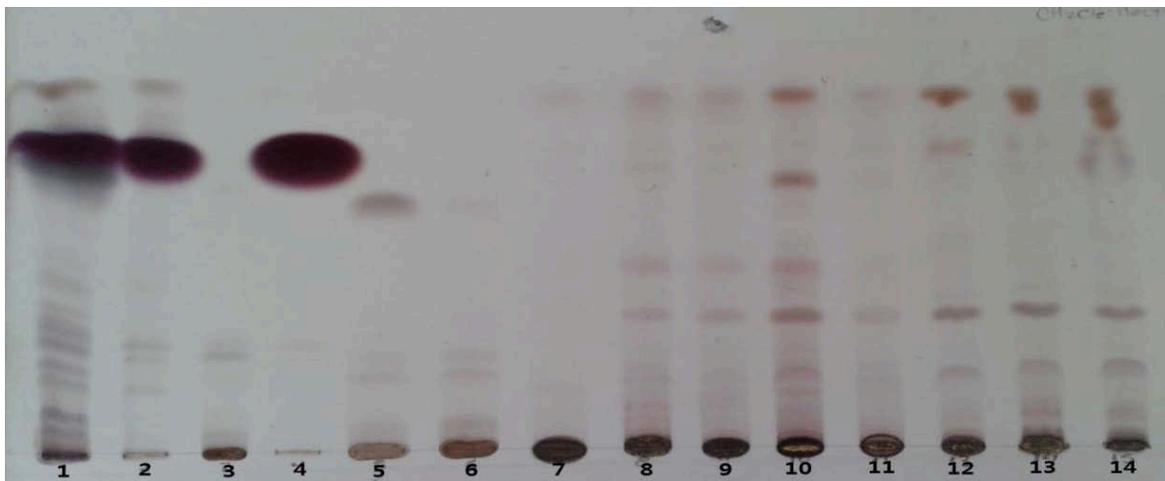


Figura 26. CCF de los extractos provenientes de cultivos *in vitro* de *C. pringlei*. Placa revelada con sulfato cérico. 1: extracto orgánico, 2: Fracción F3, 3: costunólida, 4: deshidrocostuslactona, 5: 15-isovaleriloxi costunólida, 6: 15-isovaleriloxi costunólida + 15-isobutiriloxi costunólida, 7: callo de hoja, 8: callo de raíz, 9: callo de tallo, 10: regenerantes de partes aéreas, 11: raíces regeneradas, 12: callo de tallo, 13: callo de raíz y 14: callo de hoja. Placa desarrollada con el sistema de elución CH₂Cl₂: MeOH (99:1).

c. Análisis de los extractos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Debido a la diversidad de compuestos observados en la CCF, se eligió analizar los extractos de partes aéreas (Rpa) y el callo de raíz (Cr) por CG-EM. En la **tabla 28** se muestran los componentes encontrados en el callo de raíz y en la **tabla 29** el componente encontrado en el extracto de partes aéreas. En el apéndice II se muestran los cromatogramas.

En el extracto de callo se detectaron seis compuestos, dos de los cuales corresponden a las lactonas sesquiterpénicas, una del tipo germacranólida (costunólida) y la otra del tipo guayanólida (deshidrocostuslactona). La costunólida ya había sido reportada anteriormente por Bohlmann y colaboradores (1964) en *Cosmos sulphureus*, la deshidrocostuslactona se detectó como compuesto mayoritario en las raíces silvestres de *C. pringlei* (Rivero, 2000). En el extracto obtenido de regenerantes de partes aéreas, únicamente se detectó la deshidrocostuslactona.

Tabla 28. Componentes del extracto de callo de raíz.

Pico	Compuesto	t _R (s)	Área %
1	Costunólida	674.65	1.5703
2	2(3H)-Benzofuranona,6-etenilhexahidro-6-metil-3-metileno-7-(1-metiletetil)-, [3aS-(3aà,6à,7á,7aá)]-	686.1	10.961
3	Ácido tridecanoico, metil ester	702.05	0.1843
4	4,7,10,13,16,19-ácido docosahexaenoico, metil ester, (all-Z)-	720.7	8.86.19
5	Deshidrocostuslactona	745.7	78.152
6	Triciclo[3,1,0,0(2,4)]hexano, 3,3,6,6-tetraciclopropil-	877.55	0.2703

Tabla 29. Componente del extracto a partir de regenerantes de partes aéreas.

Pico	Compuesto	t _R (s)	Área%
1	Deshidrocostuslactona	745.7	100

La CG-EM logró detectar dos de los compuestos identificados en la raíz silvestre, en los extractos provenientes de cultivos *in vitro*. A pesar de que el estado fisiológico tiene consecuencias en cuanto a la biosíntesis de productos del metabolismo secundario, la presencia de la deshidrocostuslactona en ambos tipos de tejidos (regenerantes y callos) evidencia que sí se está biosintetizando este compuesto, aunque en cantidades traza, ya que la CCF no logró detectar ninguno de los dos compuestos.

Según Kreis (2007) si el compuesto de interés se sintetiza en las raíces, entonces no aparecerá en el cultivo de brotes. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que, aunque el compuesto se sintetice en las hojas puede que su patrón y concentración sean diferentes a los que se obtienen en plantas intactas. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en ambos métodos cromatográficos utilizados en los extractos de *C. pringlei*. En la CCF se observó la presencia de la deshidrocostuslactona en el extracto orgánico (raíz silvestre) y no así en los extractos de callo de hoja, callo de tallo y en los

extractos de los regenerantes (partes aéreas); sin embargo, en la CG-EM, la deshidrocostuslactona, se identificó en el extracto de callo de raíz y en el extracto de los regenerantes (partes aéreas) sugiriendo que en este último tejido comienza la síntesis del compuesto pero es transportado hacia la raíz tuberosa en donde es almacenado.

Existen numerosos estudios en los que se obtienen determinados compuestos secundarios utilizando diferentes tipos de tejidos mediante el cultivo *in vitro*, tal es el caso del cultivo de brotes de *Lavandula officinalis* en medios de cultivo semisólidos el cual mostró mayor contenido de ácido rosmarínico que el obtenido en plantas en condiciones naturales (Wilken *et al.*, 2005). No es el caso de otras especies como *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus* y *Fabiana imbricata* donde las concentraciones de los compuestos deseados fueron menores que los obtenidos en las plantas en condiciones naturales (Riva, 2015).

Reichling y Thron (1989) realizaron un estudio comparativo sobre la producción y acumulación de fenilpropanoides en plantas y cultivos *in vitro* de *Coreopsis tinctoria* y *C. lanceolata*. La obtención del callo y los cultivos en suspensión los obtuvieron a partir de plántulas que germinaron bajo condiciones asépticas. Para *C. tinctoria* utilizaron el medio Murashige & Skoog (MS, 1986) adicionado con 2 mg/L de ANA y 5 mg/L de BA. El medio de cultivo utilizado para *C. lanceolata* fue el B5 modificado adicionado con 1 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kin. Los cultivos de raíz se establecieron de manera análoga. Éstos fueron cultivados en medio MS líquido adicionado con 30 g/L de azúcar y sin reguladores de crecimiento vegetal. Los cultivos de raíz de *C. tinctoria* se mantuvieron en constante oscuridad. En ambas especies, su capacidad para acumular fenilpropanoides inusuales fue comparada con plántulas y plantas completas. Los cultivos correspondientes al callo acumularon fenilpropanoides solo en trazas. En contraste con el callo, los cultivos de raíz acumularon los mismos patrones de fenilpropanoides que las plantas madre. Un cultivo de raíz de *C. tinctoria* acumuló los compuestos hasta las mismas cantidades que la raíz de la planta entera.

2. Actividad biológica

a. Bioensayo de toxicidad con *Artemia salina* L.

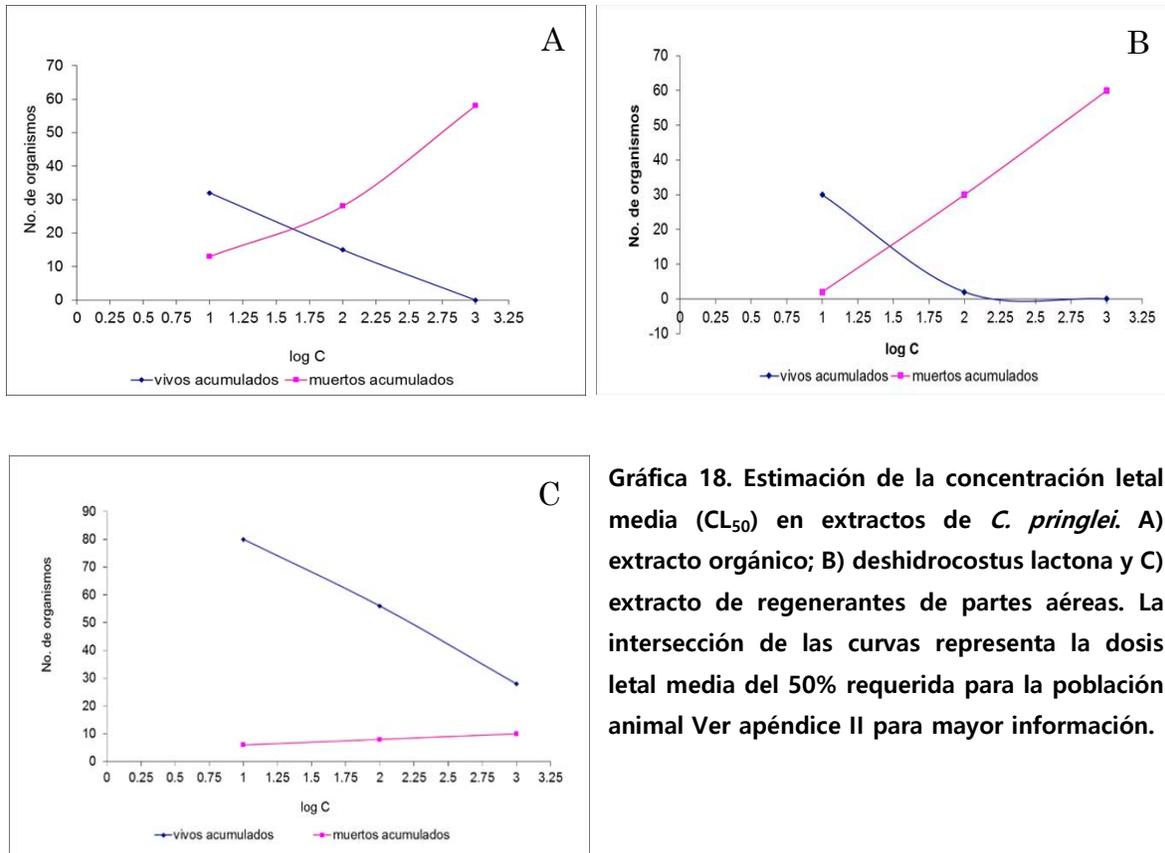
La evaluación de la actividad tóxica contra el crustáceo *Artemia salina* en el extracto orgánico de la raíz tuberosa, la deshidrocostuslactona y los regenerantes de partes aéreas, arrojaron diferentes resultados.

Al realizar el análisis en los diferentes extractos se encontró que el extracto orgánico y la deshidrocostuslactona arrojaron una toxicidad significativa (**gráfica 18A y B**), ya que la concentración letal media (CL_{50}) fue de 39.81 $\mu\text{g/mL}$ y 31.6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Cuevas (1997) quien reporta una concentración letal media (CL_{50}) de 16.4 $\mu\text{g/mL}$ para *A. salina* en el extracto clorofórmico: metanólico (1:1) a partir de la raíz de *C. pringlei*.

Por el contrario, el extracto de los regenerantes de partes aéreas no mostró toxicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas (10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) (**gráfica 18C**). Lo anterior nos indica que, aunque esté presente la deshidrocostuslactona en el extracto, no se encuentra en una concentración suficiente para evaluar la actividad tóxica.

b. Bioensayo de fitotoxicidad en *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae)

El potencial fitotóxico se determinó evaluando el efecto del extracto de regenerantes de partes aéreas (Rpa), el EO de la raíz tuberosa de *C. pringlei* (EO) y como control positivo, la deshidrocostuslactona, sobre la germinación de la especie arvense *A. hypochondriacus* mediante la aplicación del método bioautográfico.



Como se observa en la **figura 27**, las placas con el control blanco (1) y el control de disolvente (2), no inhibieron la germinación de *A. hypochondriacus* indicando que este tipo de sustancias no intervinieron en la inhibición de la germinación de las semillas en el resto de las placas.



Figura 27. Comparación de la actividad fitotóxica de regenerantes de partes aéreas contra el extracto orgánico de *C. pringlei* y la deshidrocostus lactona (estándar). 1. Agar, 2. Disolvente, 3. Semillas de *A. hypochondriacus* sobre una placa con agar con la deshidrocostus lactona (DHL), 4. Placa con el estándar de DHL, 5. Semillas de *A. hypochondriacus* sobre una placa de agar con el extracto orgánico, 6. Placa del extracto orgánico, 7. Semillas de *A. hypochondriacus* sobre una placa de agar con extracto de (Rpa) y 8. Placa de Rpa.

En las placas 3 y 4 (**figura 27**) se aplicó la deshidrocostuslactona, se observó que la germinación se inhibió (placa 3) a la altura de la mancha púrpura desarrollada en la placa 4. De la misma forma ocurrió en el extracto orgánico (placa 5) en donde se observó la inhibición de la germinación a la misma altura en la que se desarrollaron las bandas más abundantes e intensas de color café y púrpura en la placa 6.

Estos resultados concuerdan con Cuevas (1997), quien determinó la actividad fitotóxica del extracto y compuestos puros de la raíz de *C. pringlei*, sobre la germinación de semillas de *A. hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* (Poaceae), afectando notablemente la germinación de *A. hypochondriacus* de manera dependiente de la concentración. La deshidrocostuslactona y la costunólida, mostraron actividad inhibitoria en ambas especies.

Por el contrario, en la placa 7 no se observó inhibición en la germinación y, aunque en la placa 8 se observaron bandas no definidas y poco abundantes, no se identificó la deshidrocostuslactona u otro compuesto que inhibiera la germinación de las semillas. Cabe señalar que mediante la CG-EM se determinaron pequeñas trazas de deshidrocostuslactona en este tipo de extracto, pero su concentración no fue suficiente para evaluar las actividades biológicas probadas en esta investigación.

CONCLUSIONES

- ✓ **Mediante** la aplicación del Cultivo de Tejidos Vegetales se logró la regeneración de *C. pringlei*.
- ✓ **La mejor** condición para la germinación *in vitro* y en suelo de los aquenios de *C. pringlei* fue la eliminación del pericarpio.
- ✓ **Las respuestas** de los explantes cultivados fueron: 1) la formación de callo y 2) respuestas morfogénicas vía organogénesis directa, indirecta y por la activación de yemas preformadas.
- ✓ **Las regiones** apicales no mostraron afinidad por un tipo de citocinina ni por una concentración en particular, pero sí fue necesario el estímulo del RCV para aumentar el promedio en el número de brotes, en comparación con los tratamientos control en donde el promedio de brotes fue bajo.
- ✓ **El crecimiento** de los brotes y el desarrollo de las raíces en las regiones apicales, fue mayor en los tratamientos en los que estaba ausente la citocinina, evidenciando que la presencia de ésta inhibe el crecimiento en longitud de los brotes y el desarrollo de las raíces.
- ✓ **Los nudos** mostraron afinidad por la kinetina, obteniendo promedios similares y los más altos en el número de brotes. Los brotes generados en los tratamientos control, fueron los que desarrollaron mayor crecimiento, indicando que la presencia de las citocininas inhibió su crecimiento. De igual forma, las citocininas inhibieron el desarrollo de las raíces, las cuales se presentaron únicamente en los tratamientos control.
- ✓ **En la mayoría** de los nudos en los que se activaron ambas yemas axilares, uno de los brotes se desarrolló más rápido que el otro; en los nudos en los que solo se activó una yema axilar, el brote generado a su vez activó una o dos yemas axilares generando más brotes.
- ✓ **La regeneración** de brotes a partir de explantes de hoja, tallo y raíz se presentó en los tratamientos en los que únicamente se encontraba la citocinina 6-benciladenina (BA).

- ✓ **Se** desarrolló callo en todos los tratamientos; sin embargo, se obtuvo mayores porcentajes en los tratamientos que presentaron únicamente la citocinina en los explantes de hoja y tallo. En los explantes de raíz, el mayor porcentaje de callo se observó en el tratamiento que presentó la auxina ANA.
- ✓ **Bajo** las condiciones experimentales ensayadas hubo diferencias en el potencial morfogénico en cuanto al tipo de explante empleado, ya que fueron los explantes de raíz los que generaron mayor cantidad de brotes en comparación con los explantes de hoja y entrenudos.
- ✓ **El** tipo de explante que mostró un mayor número de respuestas a inducción a callo fue la raíz.
- ✓ **La** aclimatización de las plántulas en diferentes sustratos *in vitro* y en ausencia del inóculo, permitió una mejor adaptación de las plántulas a condiciones *ex vitro*; así como a la luz natural. El mejor sustrato para la sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas, fue el suelo procedente de su edafocosistema natural.
- ✓ **Se** detectó la presencia de la deshidrocostuslactona, compuesto mayoritario en las raíces silvestres de *C. pringlei*.
- ✓ **No** se detectó la presencia de la deshidrocostuslactona por CCF en los extractos de callo de hoja, entrenudos y raíz; ni en los extractos de partes aéreas y raíces regeneradas; sin embargo, el análisis por CG-EM permitió detectar cantidades trazas de la deshidrocostuslactona en extractos de callo de raíz y extractos de partes aéreas regeneradas *in vitro*.
- ✓ **En** ambas pruebas biológicas utilizadas, toxicidad en *Artemia salina* y fitotoxicidad en *Amaranthus hypochondriacus*, la concentración del compuesto no fue suficiente para que los resultados fueran concluyentes.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye el primer antecedente de propagación mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales de *Cosmos pringlei*, el cual representa un método de conservación y propagación *ex situ*. Por lo consiguiente, se desprenden las siguientes perspectivas:

- * **Optimizar** la propagación *in vitro* a través de la exploración de nuevos medios de cultivo y de reguladores de crecimiento vegetal en diferentes concentraciones, con la finalidad de mantener plántulas *in vitro* en bancos de germoplasma y como una fuente permanente de material vegetal para estudios posteriores; adicionalmente, es necesario la búsqueda de un método alternativo y a corto plazo, que permita el aumento de la sobrevivencia de las plántulas durante la etapa de aclimatización.

- * **Ampliar** el estudio fitoquímico a las partes aéreas de la planta, que como ya se demostró en este trabajo, también contienen compuestos bioactivos, lo anterior para reducir el impacto de sobrecolecta en la raíz y así evitar la muerte de la planta completa; o bien, optimizar las condiciones *in vitro* para mejorar el rendimiento en la producción de los metabolitos secundarios en los callos y regenerantes obtenidos.

- * **Explorar** métodos de propagación convencionales, como su cultivo en invernaderos, que se puedan llevar a cabo en las comunidades de la Sierra Tarahumara, en donde crece esta especie.

LITERATURA CITADA

- **Akihisa T**, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K and Tamura T. 1996. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. 43(6): 1255-60.
- **Abas F**, Shaari K, Lajis NH, Israf DA and Kalsom YU. 2003. Antioxidative and Radical Scavenging Properties of the Constituents Isolated from *Cosmos caudatus* Kunth. *Natural Product Sciences*. 9(4): 245-248.
- **Abdelnour-Esquivel AM** y Escalant JV. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. *Editorial del CATIE/CEE/CIRAD, CR*. 38 p.
- **Aguilar R**. 2007. Regeneración *in vitro* de *Dahlia sp.* vía organogénesis. Tesis que para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. Michoacán, México. 68 p.
- **Alanís GJ**, Velazco CG, Foroughbakhch R, Valdez V y Alvarado MA. 2004. Diversidad florística de Nuevo León: Especies en categoría de riesgo. *Ciencia UANL*. 7(2): 209-218.
- **Alarcón A** y Ferrera R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana*. 17(3):179-191.
- **Alvarado CY**. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez PJN. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. *Instituto de biotecnología de plantas*. Cuba. pp 81-104.
- **Amalia L**, Anggadiredja K, Sukrasno, Fidrianny I and Inggriani R. 2012. Antihypertensive potency of wild cosmos (*Cosmos caudatus* kunth, asteraceae) leaf extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 7(8): 359-368.
- **Andarwulan N**, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B and Wijaya H. 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*. 121(4): 1231-1235.
- **Andarwulan N**, Kurniasih D, Apriady RA, Rahmat H, Roto AV and Bolling BW. 2012. Polyphenols, carotenoids and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*. 4(1): 339-347.

- **Anju G** and Pawan K. 1992. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mug bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 29(3): 199-205.
- **Ayala G**. 1997. El mirasol, una de las especies con mayor potencial forrajero, alimenticio y medicinal. *Gaceta UNAM*. 16 de enero. pp 15-17.
- **Azofeifa, A**. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175.
- **Bairu MW**, Jain N, Stirk WA, Doležal K. and Van Staden. 2009b. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany* 75: 122–127.
- **Bairu MW**, Novač O, Doležal K and Van Staden J. 2011b. Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinins treatments. *Plant Growth Regul.* 63:105–114.
- **Barea JM**, Azcón-Aguilar C y Azcon R. 1992. Mycorrhiza and Crops. *In*: Tommerup IC (Ed). *Advances in plant pathology. Mycorrhiza: A synthesis*. Academic Press. New York. 363 p.
- **Barreto VM**, Linares E y Bye R. 1989. Comercialización de la cancerina (*Hippocratea excelsa* HBK.) en México. *In*: L Cervantes S y R Bye (Eds.). Programa y Resúmenes. Memoria de la Reunión Etnobotánica Ecológica Regional de Selvas Bajas Caducifolias (Bosque Tropical Caducifolio) y Vegetación Asociadas en México. México. UNAM, Instituto de Biología. pp 27-29.
- **Baskin CC** and Baskin JM. 2014. Types of seeds and kinds of seed dormancy. *In*: Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Elsevier. pp 37-77.
- **Bate-Smith EC**. 1980. Astringent tannins of *Cosmos bipinnatus*. *Phytochemistry*. 19(5): 982.
- **Berlin J**. 1988. Formation of secondary metabolites in culture plant cells and its impact on pharmacy. *In*: Bajaj YPS. Biotechnology in Agriculture Forestry. Vol 4. Medicinal and Aromatic Plants I. *Springer-Verlag*. Berlin. pp 37-59.

- **Beyl CA.** 2005. Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. *In:* Tigrano RN and Gray DJ (Eds.). Plant Development and Biotechnology. *CRC Press*. USA. 358 p.
- **Boeri P.** 2015. Nutrientes para plantas de probeta. Medios de cultivo-reguladores de crecimiento. En: Sharry S, Adema M y Abedini W (Coords.). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. pp 46-72.
- **Bohlmann F,** Bornowski H and Köhn S. 1964. Polyacetylenverbindungen, LXIV. Die Polyine der Gattung *Cosmos*. *Chem. Ber.* 97: 2583–2585.
- **Bohm BA.** Chalcones, aurones and dihydrochalcones. 1975. *In:* The flavonoids. Eds. Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H. *Springer US*. Pp. 442-504.
- **Bremer K.** 1994. Asteraceae: Cladistics and classification. *Timber Press*, Portland, Oregon. 752 p.
- **Bunawan S,** Baharum SN, Bunawan SN, Amin NM and Noor NM. 2014. *Cosmos Caudatus* Kunth: A Traditional Medicinal Herb. *Global Journal of Pharmacology*. 8(3): 420-426.
- **Bunn E** and Tan B. 2002. Microbial Contaminants in Plant Tissue Culture Propagation. *In:* Sivasithamparam K, Dixon KW & Barrett R. (eds). Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Kluwer Academic Publishers. pp. 307–335.
- **Bye R.** 1986. Medicinal Plants of the Sierra Trahumara Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*. 40(1): 103-124.
- **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. pp. 689-714
- **Canter PH,** Thomas H and Ernst E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 23(4): 180-185.
- **Carabias J, Arriaga V y Cervantes V.** 1994. Los recursos naturales y el desarrollo. *En:* Pascual P y Woldemberg J (Eds.). Desarrollo, desigualdad y medio ambiente, México: Cal y Arena. 303-345 p.

- **Castro-Castro A**, Harker M, Vargas-Amado G y Rodríguez A. 2013. Two new species of *Cosmos* section *Discopoda* (Coreopsidae: Asteraceae) from Jalisco, México. *Phytotaxa*. 146(2): 35-49.
- **Chabannes B** and Pacheco H. 1971. Biogenesis of plant pigments IV. Biogenesis of cosmosiine in *Cosmos bipinnatus* and the chemical conversion of prunine to cosmosiine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 4: 1486-1491.
- **Chae SC**. 2014. Influence of medio on *in vitro* root regeneration and micropropagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Hwiparam. *Life Science Journal*. 11(9): 797-799.
- **Chávez EK**. 2009. Aspectos etnobotánicos y de ecología reproductiva de dos plantas medicinales endémicas del noroeste de México. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 115 p.
- **Chávez VM**, 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Certozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 148 p.
- **Choi SM**, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH and Paek KY. 2000. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 62:187-193.
- **Cline LG**. 1976. Some common misconceptions concerning hormone experiments with excised plant tissue. *Plant Science Letters*. 6: 181-184.
- **Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. 2012. *Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, 2012-2030*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp 1-12.
- **CONABIO**. 2006. Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 71 p.
- **Čosić T**, Motyka V, Raspor M, Savić, Cingel A, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Trávníčková A, Dobrev PI, Bohanec B and Ninković S. 2015. In vitro shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*): effects of genotype, explant type and applied cytokinins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 121: 741-760.

- **Cousens RD**, Young KR and Tadayyon A. 2010. The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Ann. Bot.* 105: 101-108.
- **Crawford DJ**, Tadesse M, Mort ME, Kimball RT and Randle CP. 2009. Coreopsidae. In Funk VA, Susanna A, Stuessy TF and Bayer RJ (Eds.). Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. *International Association for Plant Taxonomy*. Vienna, Austria. pp. 713-730.
- **da Cruz AC**, Rocha DI, Iarema L, Ventrella MC, Costa MGC, Neto VBP and Otoni WC. 2014. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 50:76-83.
- **Cuevas-Garibay NA**. 1997. Compuestos bioactivos de la especie *Cosmos pringlei* (Asteraceae). Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biológicas. Facultad de química. UNAM. 141 p.
- **Deshmukh SR**, Wadegaonkar VP, Bhagat RP and Wadegaonkar PA. 2011. Tissue specific expression of anthraquinones, flavonoids and phenolics in leaf, fruit and root suspension cultures of Indian Mulberry (*Morinda citrifolia* L.). *Plant Omics*. 4:6-13.
- **de Souza AV**, Pinto J, Bertolucci S and Corrêa R. 2007. In vitro propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A threatened endemic medicinal plant. *HortScience*. 42(7): 1665-1669.
- **Diario Oficial de la Federación**. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/doctos/NOM-059-ECOL-2001.pdf>
- **Digonzelli P**, Díaz L y Carrizo de Bellone S. 2005. Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron (LUZ)*. 22: 22-32.
- **Douglas GC**, Heslin MC and Reid C. 1989. Isolation of *Oidiodendron maius* from *Rhododendron* and ultrastructural characterization of synthesized mycorrhizas. *Can. J. Bot.* 67: 2206-2212.

- **Fatima B**, Usman M, Ashraf T, Waseem R and Ali MA. 2007. *In vitro* shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *Dahlia* cultivars. *Pak. J. Agri. Sci.* 44(2): 312-316.
- **Fay MF**. 1994. In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. 3: 176-183.
- **Fay MF** y Clemente M. 1997. Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y conservación de especies amenazadas. *Monograf. Jard. Bot. Córdoba*. 5: 43-50.
- **Funk VA**, Susanna A, Stuessy TF, and Robinson H. 2009. Classification of Compositae. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy. 171-192.
- **Fuzzati N**, Sutarjadi, Dyatmiko W, Rahman A and Hostettmann K. 1995. Phenylpropane derivatives from roots of *Cosmos caudatus*. *Phytochemistry*. 39(2): 409-412.
- **Garay-Arroyo A**, Sánchez MP, García-Ponce B, Álvarez-Buylla ER y Gutierrez C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB*. 33(1): 13-22.
- **George EF**, Hall MA and de Klerk (Eds). 2008. Plant propagation by tissue culture. 3ra Ed. Springer. Dordrecht. 501 p.
- **George EF** and Sherrington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. *Exegetics. Limited*. Great Britain. 690 p.
- **Goleniowski M** and Trippi VS. 1999. Effect of growth medium composition on psilostachyonolides and altamisine production. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. 56:215-218.
- **González AS**. 1999. Regeneración *in vitro* de *Dahlia excelsa* Benth y *Dahlia imperialis* Roetzl. *Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo*. Chapingo, México. 97 p
- **González O**, Juárez W, Ronquillo N, Estrada B, Heredia P, Jiménez A, Mata M y Chávez V. 2012. El Cultivo de Tejidos Vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *La Vida en la Sierra*. 3(1): 5-9.

- **Gordon SP**, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P and Meyerowitz EM. 2007. Pattern formation during de *novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*. 134: 3539–3548.
- **Govindaraj S**, Ranjitha BD, Cioni PL and Flamini G. 2007. Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *Journal of Bioscience and bioengineering*. (105)3: 176-183.
- **Hawkins B**. 2008. Plants for life: Medicinal plant conservation and botanic gardens. *Botanic Gardens Conservation International*, Richmond, U. K.
- **Hagimori M**, Matsumoto T and Obi Y. 1982. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. II Effects of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiology*. 69:653-656.
- **Heinrich M**, Robles M, West JE, Ortiz de Montellano BR and Rodriguez E. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 539-65
- **Hernández JM**. 1996. Micropropagación de *Piqueria trinervia* y su sobrevivencia en suelo derivado de cenizas volcánicas del Ajusco. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 97 p.
- **Hernández JM**. 1998. Obtención de cromeros (encecalina y desmetilencecalina) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Helliantella quinquenervis* (Hook) A. Gray. Tesis de Maestría. UNAM. México, D. F.
- **Herrera J**. 2001. Estudio comparado de la producción de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa* Kunth (Hippocrateaceae), en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 94 p.
- **Hind N**. 2005. *Cosmos peucedanifolius*. *Compositae*. The Board of Trustees of the Royal Botanic gardens, Kew. pp 161-167.
- **Hosoki T, Kobayakawa H and Ohta K**. 2003. Micropropagation of Chocolate Cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) by repeated division of nodes/axillary shoots and adventitious shoots from microshoots. *Acta Hort. (ISHS)*. 625: 261-264.

- **Hurtado DV** y Merino ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed Trillas. México. Pp 44-47.
- **Hutchison CE** and Kieber JJ. 2002. Cytokinin Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 14: S47-S59.
- **Iannicelli J** y Salvio A. 2015. Diseño y organización del laboratorio de cultivo *in vitro* de plantas. Desde un área estéril a las biofabricas de producción masiva. *En: Sharry S, Adema M y Abedini W (Coords.). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro.* Universidad Nacional de la Plata. Argentina. pp: 22-45.
- **Jain N**, Bairu MW, Stirk WA and Standen V. 2009. The effect to medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. *South African Journal of Botany*. 75: 117-121.
- **Jankiewicz LS**. 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Universidad Autónoma de Chapingo. *Ed. Mundi-prensa*. México. pp: 21-93.
- **Jiménez EA**. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. *En: Pérez JN (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. pp 13-24.
- **Jiménez-Mariña L**, Fonseca-Arias M, Infante-Fonseca-S, García-Alcántara A y Vázquez-Rodríguez J. 2013. Efecto del ácido giberélico en la multiplicación *in vitro* de *Dahlia* spp. *Revista Granma Ciencia*. 17(1).
- **Kakimoto T**. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 605-627.
- **Kanellos EAG** and Pearson S. 2000. Environmental regulation of flowering and growth of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Scientia Horticulturae*. 83: 265-274.
- **Kaneta M**, Hikichi H, Endo S and Sugiyama N. 1978. Identification of flavones in sixteen Compositae species. *Agricultural and Biological Chemistry*. 42(2): 475-477.
- **Katinas L**, Gutiérrez D, Grossi A y Crisci J. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42(1-2): 113-129.

- **Kaul V**, Miller RM, Hutchinson JF and Richards D. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 21: 21-30.
- **Kozak D**, Pogroszewska E and Szmagara M. 2013. The influence of the type and orientation of explants on *in vitro* growth and development of *Cosmos atosanguineus* (Hook.) Voss. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 12(1): 41-53.
- **Kreis W**. 2007. *In-vitro* culturing techniques of medicinal plants. In: Kayser O, Quax W (Eds). Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*. pp. 157-185.
- **Kubitzki K**, Rohwer JG and Bittrich V. 1990. The families and genera of vascular plants. *Berlin: Springer-Verlag*. (1).
- **Lee CW**, Nichols JT, Wang L and Ke S. 1994. Plant regeneration in *Coreopsis lanceolata* L. from leaf tissue cultures. *HortScience*. 29(11): 1353-1354.
- **Lee TK** and Vairappan CS. 2011. Antioxidant antibacterial and cytotoxic activities of essential oils and ethanol extracts of selected South East Asian herbs. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(21): 5284-5290.
- **Leifert C.**; Morris EC y Waites WM. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue and field grown plant: Reasons for contaminations problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13(2): 139-183.
- **Liu X-N**, Zhang X-Q, Zhang S-X and Sun J-S. 2007. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 91:1-7.
- **Loh SP** and Hadira O. 2011. *In vitro* inhibitory potential of selected Malaysian plants against key enzymes involved in hyperglycemia and hypertension. *Malaysian Journal of Nutrition*. 17(1): 77-86.
- **Mallón R**, Rodríguez-Oubiña J and González ML. 2011. Shoot regeneration from *in vitro*-derived leaf and root explants of *Centaurea ultreiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 106: 523–530.

- **Marks TR** and Simpson SE. 1994. Factors affecting shoot development in apically dominant Acer cultivars *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 69: 543-551.
- **Martínez M.** 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. *Fondo de Cultura Económica*. México, DF. pp 48.
- **Márquez MS.** 2007. Regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* y evaluación de su potencial como bioinsecticida contra *Spodoptera frugiperda*: gusano cogollero del maíz. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 98 p.
- **Marx DH.** 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of ectomycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- **Marzinek J,** Cavalari de-Paula O and Trombert DM. 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Revista Brasil. Bot.* 31(3): 549-553.
- **Mata R,** Rivero-Cruz I, Rivero-Cruz B, Bye R and Timmermann B. 2002. Sesquiterpene Lactones and Phenylpropanoids from *Cosmos pringlei*. *J. Nat. Prod.* 65: 1030-1032.
- **Mateo G** y Laguna E. 2004. Especies de la flora Valenciana descritas por Cavanilles. *Flora Montiberica.* 28: 23-28.
- **Mediani A.,** Abas F, Khatib A, Maulidiani H, Shaari K, Choi YH and Lajis NH. 2012. 1H-NMR malaysia based metabolomics approach to understanding the drying effects on the phytochemicals in *Cosmos caudatus*. *Food Research International.* 49(2): 763-770.
- **Mendoza M,** Castro D, Mera LM, Chávez EK y Bye R. 2009. Plantas medicinales utilizadas por los Rarámuri de la Sierra Tarahumara, Chihuahua. *Publicación de Difusión núm. 1. Jardín Botánico, Instituto de Biología-UNAM.* 32 p.
- **Mirabbasi SM** and Hosseinpour B. 2014. Prevention of shoot tip necrosis, hyperhydricity and callus production associated with *in vitro* shoot culture of *Ulmus glabra*. *Journal of Novel Applied Sciences.* 3(6): 683-689.
- **Mohamed N,** Sahnugi Z, Ramli ESM and Muhammad N. 2013. The effects of *Cosmos caudatus* (ulam raja) on dynamic and cellular bone histomorphometry in ovariectomized rats. *BMC Research Notes.* 6(1): art. no. 239.

- **Morte MA** y Honrubia M. 1996. Método para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia claveryi*. Solicitud de Patente no. 9402430. Oficina Española de Patentes y Marcas. España. 8 p.
- **Morte MA**, Cano A, Honrubia M and Torres P. 1994. *In vitro* mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). *Agricultural Science in Finland*. 3(3): 309-314.
- **Mustafa RA**, Hamid AA, Mohamed S and Bakar FA, 2010. Total phenolic compounds flavonoids and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science*. 75(1): C28-C35.
- **Nairn B**, Furneaux R and Stevenson T. 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 43: 1-11
- **Navarro LC** y Avendaño S. 2002. Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México. *Polibotánica*. 14: 67-84.
- **Nazari F**, Khosh-Khui M, Azadi P, Salehi H and Niazi A. 2014. Growth regulators affected *in vitro* propagation of pot gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink). *International Journal Agriculture and Biosciences*. 3(4): 185-189.
- **Norazlina M**, Ehsan SZ, Noor 'Adilah K, Lee CP, Farhana E, Derick P, Ima-Nirwana S, Nazrun AS and Norliza M. 2013. Acute toxicity study of *Cosmos caudatus* on biochemical parameters in male rats. *Sains Malaysiana*. 42(9): 1247-1251.
- **Ocegueda S**, Moreno E y Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*. 62: 12-15.
- **Oku T**, Takahashi H, Yagi F, Nakamura I and Mii M. Hybridisation between chocolate cosmos and yellow cosmos confirmed by phylogenetic analysis using plastid subtype identity (PSID) sequences. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 3: 323-327.
- **Olivas MP**. 1999. Plantas medicinales del estado de Chihuahua. *Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Centro de Estudios Biológicos*. Ciudad Juárez Chihuahua. 127 p.

- **Olmos S**, Luciani G y Galdeano E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E y Mroginski L (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio. Argentina. pp 161-172.*
- **Orellana P**. 1998. Propagación vía organogénesis. *En: Pérez (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. pp 151-178.*
- **Orlita A**, Sidwa-Gorycka M, Kumirska J, Malinski E, Siedlecka E, Gajdus J, Lojkowska E and Stepnowski P. 2008. Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors. *Biotechnol Prog.* 24:128-133.
- **Ortega-Larrocea MP**. 1996. Micorrización arbuscular de *Cosmos atrosanguineus* como un mecanismo preadaptativo a su establecimiento en suelo. Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología). UNAM. 85 p.
- **Ortega-Larrocea MP**, Chávez V y Bye R. 1997. Micropropagación y establecimiento *ex vitro* de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss. *En el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Amaranto.* 10(1): 1-9.
- **Ortiz-Bermúdez E**, Villaseñor JL y Téllez O. 1998. La Familia Asteraceae en el Estado de Nayarit (México). *Acta Botánica Mexicana.* 44: 25-57.
- **Pan MJ** and van Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture- A review. *Plant Growth Regulation.* 26: 155-163.
- **Panero JL** and Funk VA. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington.* 115: 909-922.
- **Parveen S** and Shahzad A. 2011. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. From root explants. *Acta Physiologiae Plantarum.* 33:789-796.
- **Pasternak T**, Potters G., Caubergs R and Jansen MA. 2005. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and celular level. *Journal of Experimental Botany.* 56(418): 1991-2001.
- **Pérez-Alonso N y Jimenéz E**. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal.* 11(4): 195-211.

- **Pérez EM**, Ramírez MR, Nuñez PHG y Ochoa AN. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 p.
- **Pierick R**. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-prensa. Madrid, España. 326 p.
- **Pimienta E**, Muñoz A, Ramírez BC y Méndez L. 2006. Desarrollo vegetal. *Universidad de Guadalajara*. 331 p.
- **Pospíšilová J**, Tichá I, Kadleček P, Haisel D and Plzáková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 42(4): 481-497.
- **Preece JE.**, Huetteman CA., Ashby WC and Roth PL. 1991. Micro- and Cutting Propagation of Silver Maple. I. Results with Adult and Juvenile Propagules. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(1):142-148.
- **Prusinkiewicz P.**, Crawford S., Smith RS., Ljung K., Bennet T., Ongaro V and Leyser O. 2009. Control of bud activation by an auxin transport switch. *PNAS*. 106(41): 17431-17436.
- **Pupilli F**, Damiani F, Nenz E and Arcioni S. 1992. *In vitro* propagation of *Medicago* and *Lotus* species by node culture. *In Vitro Cell Developmental Biology*. 28P: 167-171.
- **Primack RB**. 1987. Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 409-430.
- **Rajanna L** and Shailaja GS. 2015. *In vitro* Axillary Bud Proliferation and Direct Organogenesis of *Aristolochia tagala* cham: A rare Medicinal Plant. *Research & Reviews: Journal of Botany*. 4(2): 21-28.
- **Ramachandra S** and Ravishankar GA. 2002. Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20: 101-153.
- **Rancillac M**. 1982. Multiplication végétative *in vitro* et synthèse mycorhizienne: Pin maritime-Hebelome, Pisolithe. *In: Les Mycorrhizes: biologie et utilisation*. Ed. INRA Publ. (Les Colloques de l'INRA, no. 13).
- **Rao SR** and Ravishankar GA. 2002. Plant cell culture: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20:101-153.
- **Rasdi NHM**, Samah OA, Sule A and Ahmed QU. 2010. Antimicrobial studies of *Cosmos caudatus* Kunth. (Compositae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(8): 669-673.

- **Razdan MK.** 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. *Science Publisher*. USA. 375 p.
- **Redonda-Martínez R y Villaseñor-Ríos JL.** 2011. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Departamento de Botánica. 89: 1-64.
- **Reichling J** and Thron U. 1989. Comparative study on the production and accumulation of unusual phenylpropanoids in plants and *in vitro* culture of *Coreopsis tinctoria* and *C. lanceolata*. *Pharm. Weekbl. Sci.* 11(3):83-86.
- **Riva MS.** 2015. Las plantas como bio-fábricas. Plantas medicinales-Metabolitos secundarios. *En:* Sharry S, Adema M y Abedini W (coords). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. *Libros de cátedra. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.* pp 145-156.
- **Rivero-Cruz I.** 2000. Compuestos bioactivos de *Cosmos pringlei* Rob. & Fern. (Asteraceae). Determinación de la configuración absoluta del 8 α , 13-epoxi-labdano-14S, 15 diol. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Química-Farmacéutica). UNAM. 89 p.
- **Roca WM** y Mroginski LA. (eds). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. *Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia.* 970 p.
- **Rodríguez A,** Harker M, Quezada-Solís A y Casillas-Gaeta S. 2006. Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA.* 610-619.
- **Rodríguez-Bernal A,** Piña-Escutia JL, Vázquez-García LM and Arzate-Fernández AM. 2013. Genetic diversity of *Cosmos* species revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetics and Molecular Research.* 12(4): 6257-6267.
- **Rout GR,** Samantaray S and Das P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances.* 18: 91-120.
- **Rzedowski GC** y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. *Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.* Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 p.
- **Saito K.** (1979). Quantitative variation of flavonoids and related compounds in *Cosmos bipinnatus*. *Acta Societatis Botanicarum Poloniae.* 48: 317-32.

- **Saito K.** (1974). Distribution of flavonoids and related compounds in various parts of *Cosmos bipinnatus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 71(1): 80-82.
- **Salehan NM**, Meon S and Ismail IS. 2013. Antifungal activity of *Cosmos caudatus* extracts against seven economically important plant pathogens. *International Journal of Agriculture and Biology*. 15(5): 864-870.
- **Salisbury FB** y Ross CW. 1992. Plant physiology 4th Edition. Wasdworth, Belmont, CA.
- **Santamarina J.** 2006. Enraizamiento de esquejes de Cosmos (*Cosmos bipinnatus* Cav.) mediante el uso de auxinas. *Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias*, UNAM. 113 p.
- **Santiago-Cruz MA**, Villagrán-Vargas E, Velazquez-Rodriguez AS, Vernon-Carter EJ, Cruz Sosa F, Orozco-Villafuerte J and Buendía-González L. 2014. Exploring the Cr(VI) Phytoremediation Potential of *Cosmos bipinnatus*. *Water Air Soil Pollut.* 225:2166.
- **Sato A**, de Lima SS, Affonso VR, Esquibel MA and Lage CLS. 2006. Micropropagation of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert: A shock treatment model with growth regulators. *Scientia Horticulturae*. 109: 160-164.
- **Sherff EE.** 1932. Revision of the Genus *Cosmos*. *Field Museum of Natural History*. Chicago, USA. (8)6: 468 p.
- **Sherff EE y Alexander EJ.** 1955. Compositae-Heliantheae-Coreopsidinae. En: North America Flora. Serie II. *The New York Botanical Garden*. 149 p.
- **Shimokoriyama M** and Geissman TA. 1960. Anthochor pigments XIV. The pigments of *Viguiera multiflora* and *Baeria chrysostoma*. *J. Org. Chem.* 25: 1956-1959.
- **Shui G.**, Leong LP and Shih PW. 2005. Rapid activity and total phenolic content in aqueous screening and characterisation of antioxidants of *Cosmos caudatus* using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 827(1): 127-138.
- **Silva CV**, Oliveira LS, Loriato VAP, Silva LC, Campos JMS, Viccini LF, Oliveira EJ and Otoni WC. 2011. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 107: 407–416.

- **Simões C**, Albarello N, Callado CH, Castro TC and Mansur E. 2009. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 98:79–86.
- **Skoog F and Miller CO**. 1958. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-130.
- **Soberón JM** y Llorente JB. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Revista de la Sociedad Mexicana de historia natural*. 44: 3-17.
- **Soto-Trejo F**, Palomino G y Villaseñor JL. 2011. Números cromosómicos de Asteraceae de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), México, Distrito Federal. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82: 383-393.
- **Souza PRM**. 2014. Fisiologia da germinação das cipselas heteromórficas em *Bidens* L. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Brasil. 105 p.
- **Starman TW**, Cerny TA and Mackenzie AJ. 1995. Productivity and profitability of some field-grown speciality cut flowers. *Horstscience*. 30: 1217-1220.
- **Su YH**, Liu YB and Zhang XS. 2011. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*. 4: 616–625.
- **Sujatha G**, Ranjitha Kumari BD. 2012. Establishment of fast growing *in vitro* root culture system in *Artemisia vulgaris*. *J Agric Technol*. 8:1779–1790.
- **Sukrasno S**, Fidriany I, Anggadiredja K, Handayani WA and Anam K, 2011. Influence of drying method on flavonoid content of *Cosmos caudatus* (Kunth) leaves. *Research Journal Medicinal Plant*. 5(2): 189-195.
- **Sutarjadi NF**, Dyatmiko W, Rahman A and Hostettmann K. 1995. Phenylpropane derivatives from roots of *Cosmos caudatus*. *Pergamon Journal of Phytochemistry*. 39(2): 409-412.
- **Taiz L** and Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 764 p.

- **Tapia Muñoz JL.** 2010. La familia Asteraceae. *Herbario CICY, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY)*. 2: 82–84.
- **Taylor J,** Rabe T, McGaw L, Jäger A and Van Staden J. 2001. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regulation*. 34: 23-37.
- **Telleria M.** 2009. Asteraceae visited by honeybees in Argentina: a record from entomopalynological studies. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 44 (1-2): 65-74.
- **Teixeira da Silva JA.** 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 79: 1-18.
- **Thomas TD.** 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 26: 618-631.
- **Tiwari AK,** Tiwari TN and Prasad SR. 2016. Seed dormancy in ornamental plants: A review. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 86(5): 580-92.
- **Trader BW,** Gruszewski HA, Scoggins HL and Veilleus RE. 2006. Somaclonal Variation of *Coreopsis* regenerated from leaf explants. *HortScience*. 41(3): 749-752.
- **Ungureanu L,** Chirila C, Matei E and Calmus E. 1991. The anatomy of the dye-producing species *Cosmos bipinnatus* Cav. and *Cosmos sulphureus* Cav. Lucrari Stiintifice, Institutul Agronomic ' Nicolae Balcescu', Bucuresti. *Seria B, Horticultura*. 34(1): 7-15.
- **Vanegas EP,** Cruz HA, Valverde ME and Paredes-López O. 2002. Plant regeneration via organogenesis in marigold. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69: 279-283.
- **van Staden J,** Fennell C and Taylor N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*. 725: 55-62.
- **Vargas-Amado G,** Castro-Castro A, Harker M, Villaseñor JL., Ortiz E y Rodríguez A. 2013. Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (Asteraceae: Coreopsideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 536-555.
- **Vázquez V,** Godínez-Guevara L, Montes M y Ortiz-Gómez A. 2004. Los quelites de Ixhuapan, Veracruz: disponibilidad, abastecimiento y consumo. *Agrociencia*. 38(4): 445-455.
- **Verpoorte R,** van der Heijden R and Memelink J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*. 9:323-343.

- **Vetsberg M.** 1992. The effect of growth substrate and fertilizer on the growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of three hosts. *Agric. Sci. Finl.* 1: 95-105.
- **Villalobos A** y Thorpe TA. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *En: Roca WN y Mogrinsky LA (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cuba. pp 127-171.*
- **Villaseñor JL** y Ortiz E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 85: 134-142.
- **Villegas** y de Gante M. 1979. Malezas de la Cuenca de México. *Instituto de Ecología, Museo Natural de la Ciudad de México.* 305 p.
- **Vilma CC.** 2010. Utilización de cultivo de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. *En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E y Mroginski L (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio. Argentina. pp 481-494.*
- **Wang CK,** Hsu SY, Chen PY and To KY. 2012. Transformation and characterization of transgenic *Bidens pilosa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 109(3): 457-464.
- **Wang WC,** Tronchet M, Larroque N, Dorion N and Albouy J. 1998. Production of virus free Dahlia by meristem-culture and virus detection through cDNA probes and ELISA. *Acta Horticulturae.* 234: 421-428.
- **Wha, T.** 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. *In: Bioactive Natural Products.* pp 441–457.

APÉNDICES

Apéndice I

Ensayos preliminares en la micorrización arbuscular de *Cosmos pringlei*

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia y aislar esporas o micelios de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) asociados a *C. pringlei*, con la finalidad de inocular las plántulas obtenidas *in vitro* y determinar si hay un mayor porcentaje de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

Control de calidad del inóculo de HMA en suelos nativos

Se recolectaron cuatro tipos diferentes de suelo en la Sierra Tarahumara el 15 de octubre de 2012. La toma de las muestras se realizó a 10 cm de distancia de la planta a una profundidad a la altura del sistema radicular (aproximadamente de 4 a 15 cm). El peso seco de cada muestra se observa en la **tabla 30**.

Tabla 30. Peso seco del suelo recolectado en Chihuahua.

Sustrato	Seco (g)
Cp-1	1402
Cp-2	712
Cp-3	527
Cp-4	561

Para aumentar el volumen de cada una de las muestras y determinar la presencia de micorrizas; se realizó lo siguiente:

- * Cada uno de los suelos se dejó secar completamente a temperatura ambiente para tomar el peso seco (**tabla 30**). Posteriormente, se tamizó en un tamiz con un diámetro de apertura de 2 mm, para homogenizarlo. Por otro lado, a sustrato de hojarasca llamado "tierra negra" y adquirido de manera comercial, se le realizaron

seis esterilizaciones durante 40 minutos. Con ambos sustratos, se realizó una mezcla suelo original:tierra negra (1:1) v.v. La mezcla se colocó en macetas de plástico y se sembraron semillas de pasto (plantas hospederas), las cuales se desinfectaron de la siguiente manera: a) jabón antibacterial al 20% por 30 min y b) solución de cloro comercial al 30% por 20 min. El objetivo de este punto es que los hongos micorrízicos presentes en el suelo original inoculen las raíces de la planta hospedera (pasto). Las plantas se regaron cada tercer día con agua corriente y una vez al mes con la solución nutritiva Long Ashton (**tabla 31**) con 2 ppm de fósforo, por un período de seis meses. Después de este tiempo, se cosechó la parte aérea del pasto y se tomaron tres alícuotas de la mezcla junto con raíces, para determinar la presencia de micorrizas y esporas. La determinación se llevó a cabo mediante el análisis del suelo y el procedimiento de aclaramiento de las raíces.

Tabla 31. Solución nutritiva Long Ashton (1952).

Macronutriente	mg/L
KNO_3	404
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	944
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	368
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	93*
Oligoelementos	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.69
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.29
H_3BO_3	3.1
NaCl	5.9
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8 g/L
EDTA-Fe	1.4 mL/L

*Se sustituyó el $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se realizaron los cálculos correspondientes para aumentar las moléculas de agua.

*Originalmente se usan 278 mg/L, lo que resulta en una concentración de fósforo de 41 ppm. En este caso la concentración se requiere minimizar para que se pueda llevar a cabo la simbiosis micorrízica que requiere condiciones de poco fósforo para que se promueva.

El suelo se colocó en un vaso de precipitados y se adicionó 1 L de agua del grifo, se homogenizó y posteriormente se dejó sedimentar aproximadamente durante un minuto. El sobrenadante se vertió en un tamiz de 37 micras de apertura y se repitió varias veces esta operación hasta que ésta se observó transparente. El residuo se repartió en cajas de Petri y posteriormente se observaron bajo el microscopio estereoscópico (Olympus SZ2-ILST) para aislar las esporas. Las esporas aisladas se montaron en un portaobjetos utilizando PVLG para fijar las estructuras. Se observaron en el microscopio óptico binocular DME/Leica.

Control de calidad en raíces silvestres y raíces de la planta hospedera

Ambos tipos de raíces se enjuagaron con agua corriente para retirar por completo los restos del sustrato, se cortaron en segmentos de 2-4 cm de largo y se homogeneizaron. Los fragmentos se introdujeron dentro de un tubo de ensaye y se adicionó una solución de KOH al 10% hasta que las raíces estuvieran totalmente cubiertas por la solución. Se colocaron en una estufa a 40 °C por 12 h hasta observar la raíz transparente. Una vez que las raíces se aclararon, el KOH se neutralizó con HCl al 10% por 30 min. Transcurrido este tiempo, las raíces se colocaron en un tamiz y se enjuagaron bajo el grifo. Posteriormente, se secaron con papel y se colocaron en una solución de azul de tripano por 20 min para observar la presencia o ausencia de micorrizas arbusculares. Las muestras se colocaron en portaobjetos utilizando PVLG como medio de montaje. Las muestras se observaron en un Microscopio óptico binocular DME/Leica.

Control de calidad del inóculo comercial (SPECTRUM® MicoBac)

Se tomó una alícuota de la suspensión del inóculo comercial de 5 mL para evaluar el control de calidad de las esporas, es decir, número de esporas de aspecto viable. Se encontró un máximo de 5 esporas potencialmente viables idénticas del género *Glomus* lo que resulta una densidad muy baja para garantizar la colonización micorrízica. En la

suspensión también se encontraron fragmentos minúsculos de raíces (<5 mm) con micelio externo de HMA aunque no se verificó si estaban colonizadas.

Resultados preliminares

Análisis de HMA en suelo nativo

En el análisis de las muestras del suelo nativo, se identificaron morfotipos del género *Glomus* spp. (**figura 28 A-G**) y otro tipo de esporas que no se determinaron, las cuales presentaban un tipo de ornamentaciones en las paredes (**figura 28 J**) similares a las que se presentan en el género *Acaulospora* aunque no se corroboró la tinción de las paredes internas con yoduro y no se vio a mayores aumentos si las paredes celulares corresponderían a un hongo arbuscular. Las esporas obtenidas en las muestras de los suelos nativos en su mayoría estaban muertas y muchas no se encontraban con citoplasmas viables en su aspecto morfológico (gránulos de lípidos, volumen y brillo homogéneo, sin daño aparente de paredes y con una esporosfera con adherencias) excepto tres de ellas posiblemente del género *Glomus* (**figura 28 I y J**).

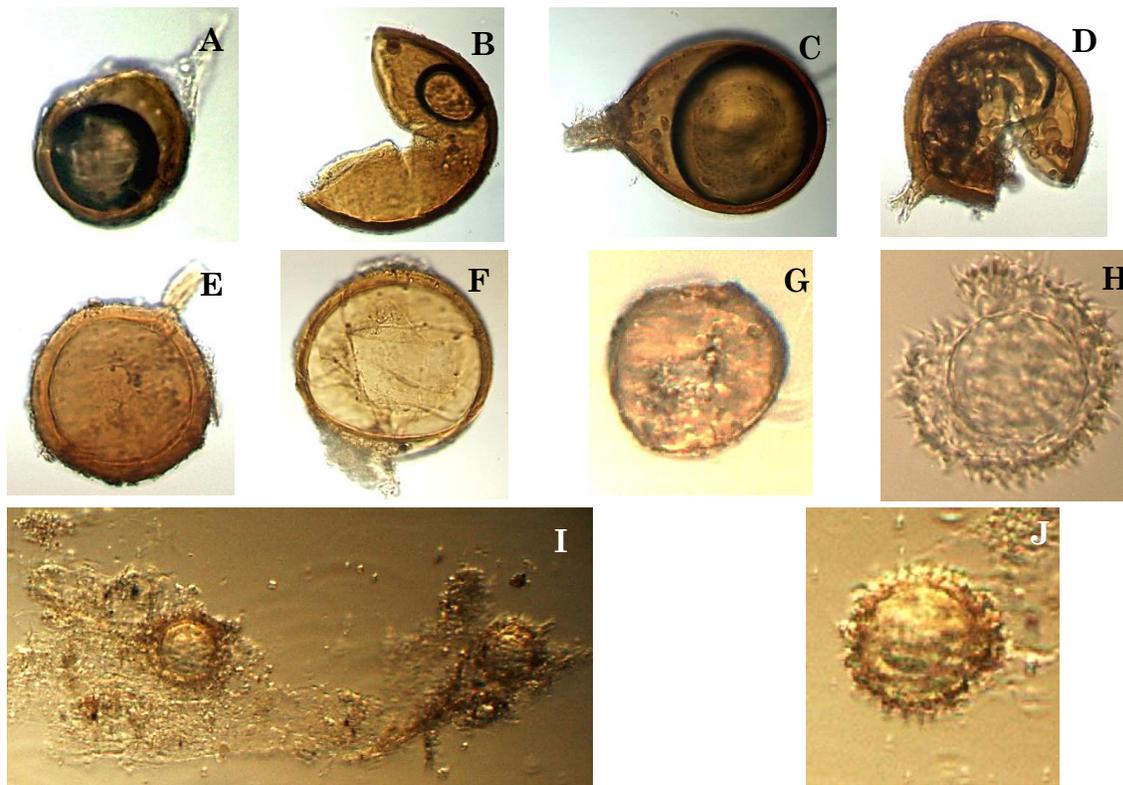


Figura 28. Morfoespecies de hongos micorrízicos arbusculares encontradas en la rizósfera de *C. pringlei*. A, B, C, D, E Y F) esporas no viables del género *Glomus* a 200 aumentos; G) espora grande tomada a 400 aumentos. H) Aspecto de una posible espora del género *Acaulospora* tomada a 400 aumentos, sin estudio de pared y tinción con iodo. I y J) esporas de *Glomus* spp. posiblemente viables por su esporosfera tomadas a 200 aumentos.

Análisis de HMA en plantas hospederas y raíces de *C. pringlei*.

Los resultados obtenidos en las raíces hospederas, arrojaron la ausencia de esporas e hifas (**figura 29 A y B**) al observarlas en el microscopio óptico. Lo anterior se puede deber a que la recolecta del suelo no fue la adecuada, es decir, a nivel de la rizósfera que es en donde se encuentran estos organismos. Por otro lado, las raíces silvestres teñidas de *C. pringlei* (**figura 29 C**) presentaron estructuras de posible colonización como esporas intraradicales (**figura 29 D-F, flechas rojas**) e hifas (**figura 29 G**), estas últimas se observaron en la superficie de la raíz.

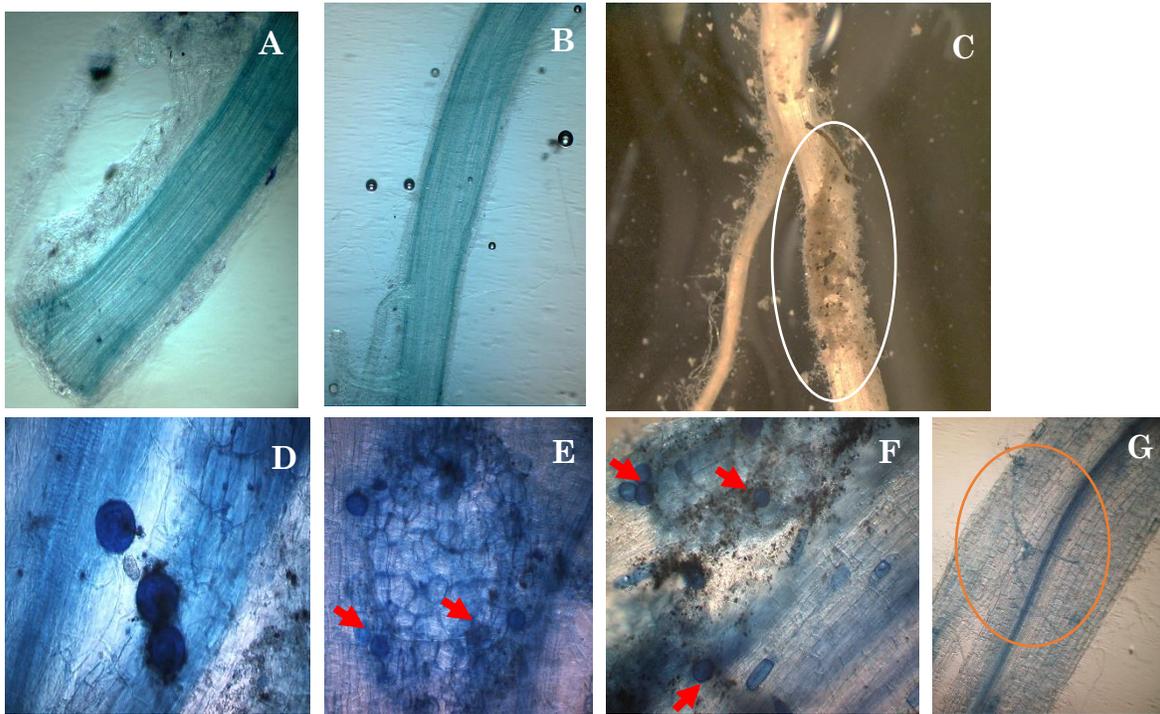
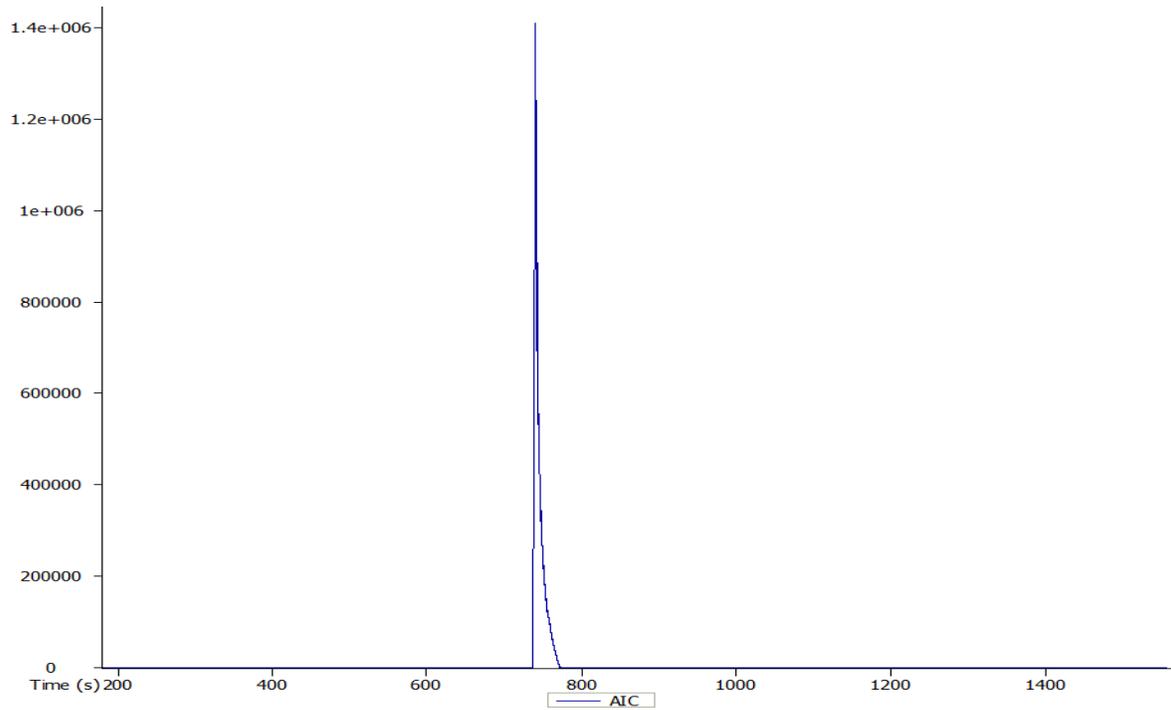


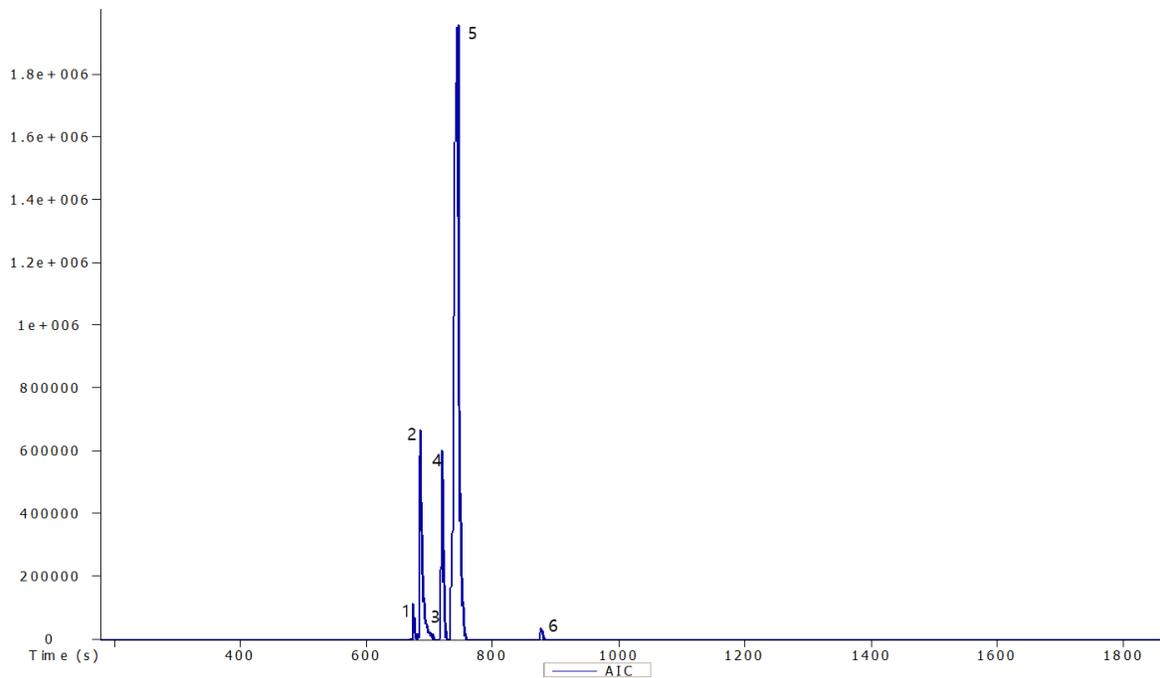
Figura 29. Microfotografías de raíces teñidas con tinción de azul de tripano (excepto C). A y B) raíces de las plantas hospederas montadas en el experimento de plantas trampa donde no se encontró colonización intraradical; C-G) Raíces de *C. pringlei*. C) Aspecto de una raíz en el suelo originario de Chihuahua. Se observa un área cubierta con micelio de HMA que se vió montada en microscopio (circulo blanco); D-F) evidencia de esporas arbusculares en la raíz y alrededor del sistema vascular (flechas) y G) probable interacción del micelio con células de la raíz de manera superficial formando apresorios o puntos de inicio de la colonización HMA.

Apéndice II

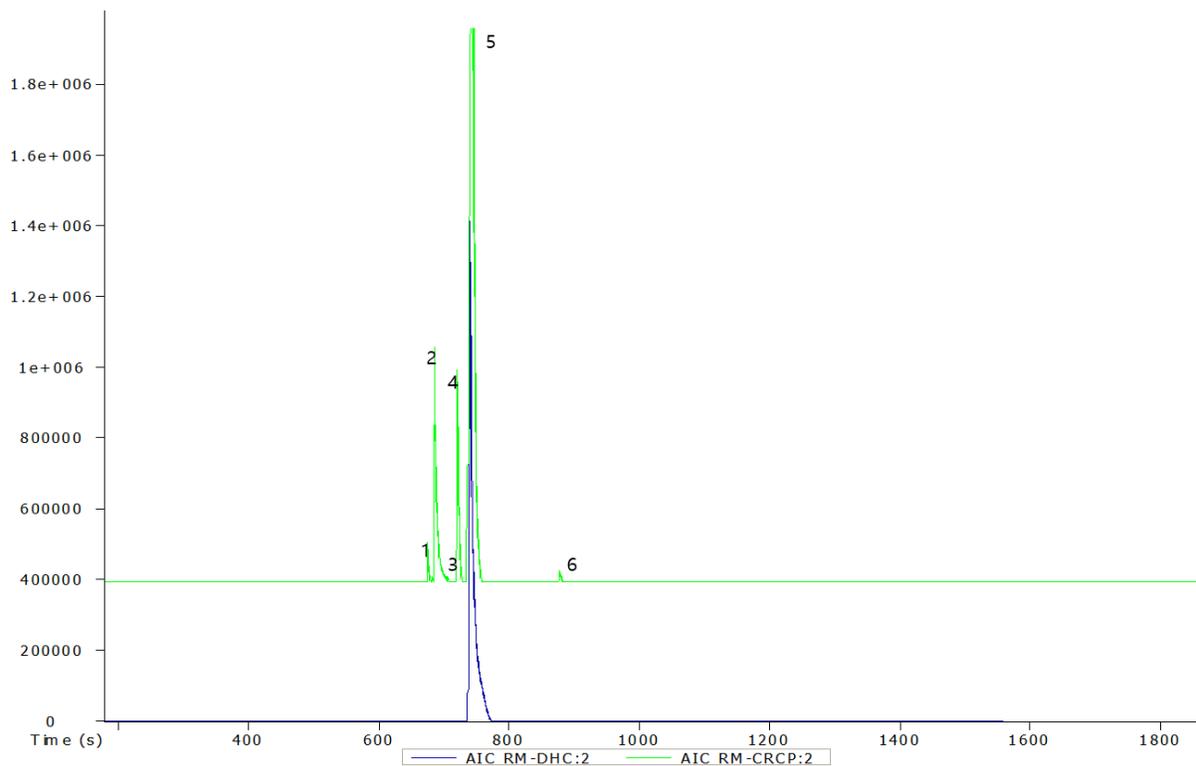
Cromatogramas de CG-EM



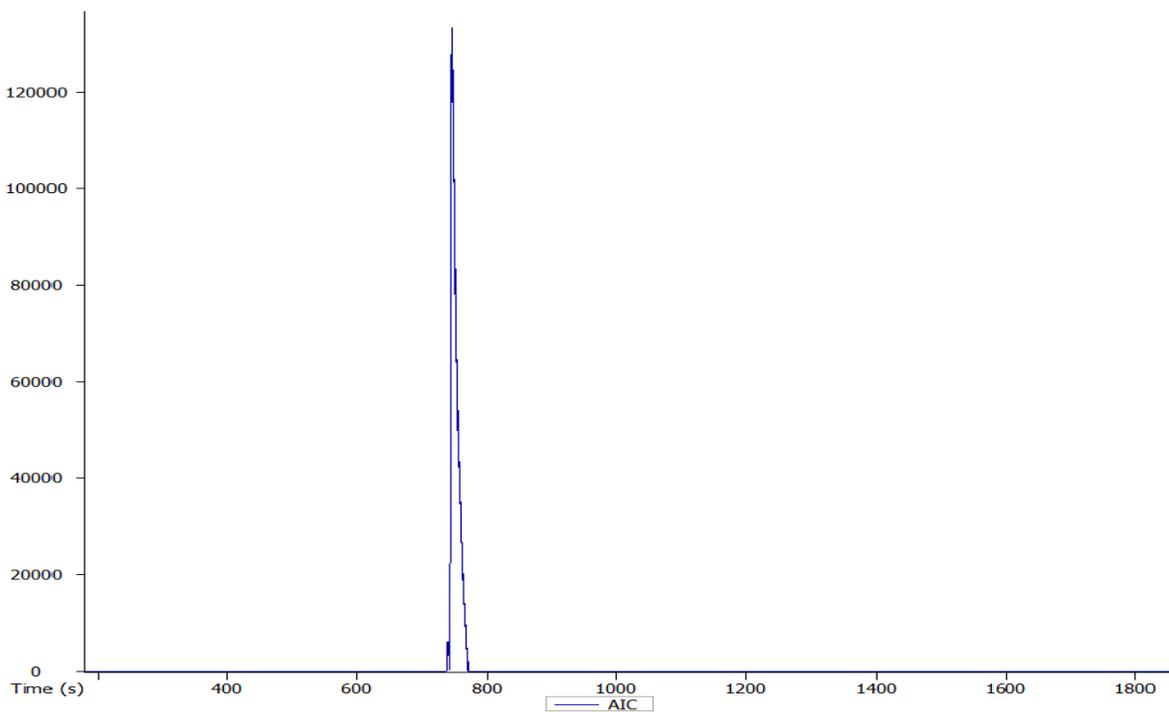
Cromatograma 1. *Deshidrocostus lactona*

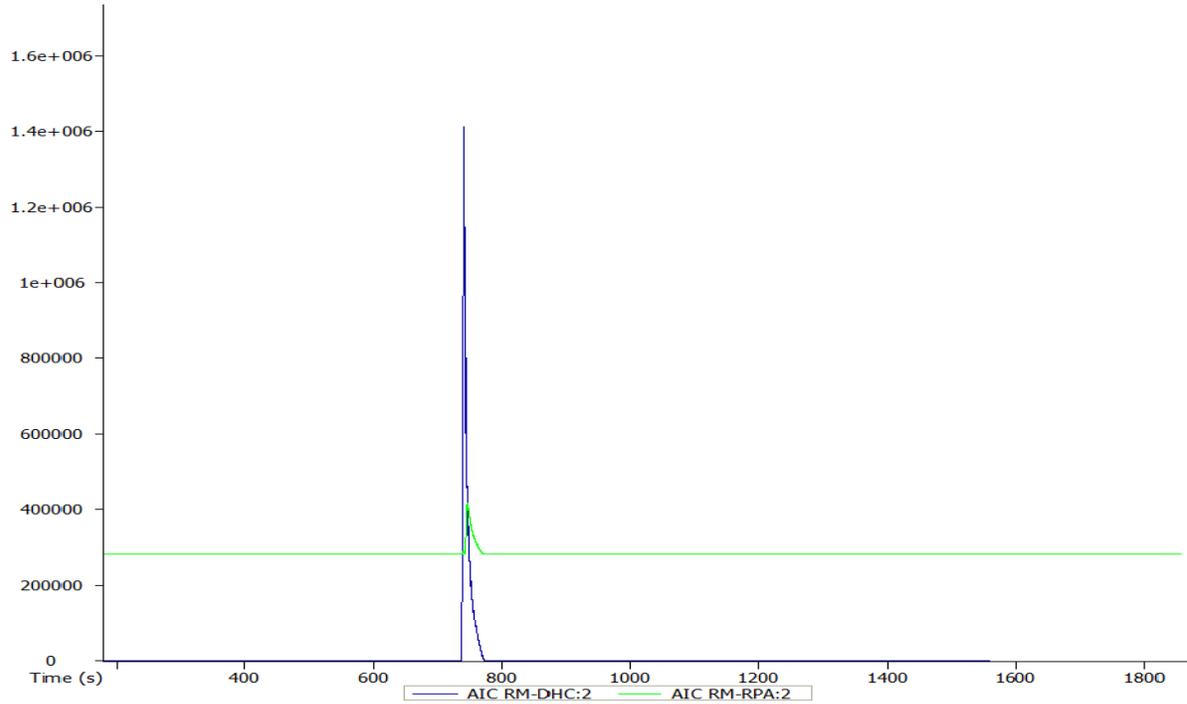


Cromatograma 2. Callo de raíz de *C. pringlei*



Cromatograma 3. Comparación de callo de raíz de *C. pringlei* (verde) con la deshidrocostus lactona (azul)



Cromatograma 4. Regenerantes de partes aéreas de *C. pringlei***Cromatograma 5. Comparación de los regenerantes de partes aéreas de *C. pringlei* (verde) con la deshidrocostus lactona (azul).**

Apéndice III

Tablas de mortalidad del bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* Leanch.Extracto orgánico de *Cosmos pringlei*

Dosis (mg/mL)	Dosis (log dosis)	#vivos	#muertos	#vivos acumulados	#muertos acumulados	relación	Mortalidad (%)
1000	3	0	30	0	58	1.0	100.0
100	2	15	15	15	28	0.7	65.1
10	1	17	13	32	13	0.3	28.9

DHC deshidrocostus lactona

Dosis (mg/mL)	Dosis (log dosis)	#vivos	#muertos	#vivos acumulados	#muertos acumulados	relación	Mortalidad (%)
1000	3	0	30	0	60	1.0	100.0
100	2	2	28	2	30	0.9	93.8
10	1	28	2	30	2	0.1	6.3

Regenerantes de partes aéreas

Dosis (mg/mL)	Dosis (log dosis)	#vivos	#muertos	#vivos acumulados	#muertos acumulados	relación	Mortalidad (%)
1000	3	28	2	28	10	0.3	26.3
100	2	28	2	56	8	0.1	12.5
10	1	24	6	80	6	0.1	7.0