



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**CULTIVO *in vitro* Y EFECTO DE RADIACIÓN GAMMA EN COSMOS
CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*)**

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

ROSA ISELA MARTINEZ CONTRERAS

Bajo la supervisión de:

Dra. MA TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN



Chapingo, Estado de México, mayo de 2025.

**CULTIVO *in vitro* Y EFECTO DE RADIACIÓN GAMMA EN COSMOS
CHOCOLATE (*Cosmos atrósanguineus*)**

Tesis realizada por ROSA ISELA MARTINEZ CONTRERAS bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

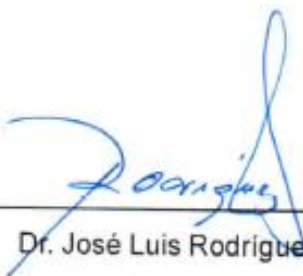
DIRECTOR:


Dra. Ma Teresa Martínez Damián

ASESOR:


Dra. María Teresa Beryl Colinas y León

ASESOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
DEDICATORIA.....	xi
AGRADECIMIENTOS	xii
DATOS BIOGRÁFICOS	xiii
RESUMEN GENERAL.....	xiv
GENERAL ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 La floricultura en México.....	3
2.2 Potencial en la floricultura y conservación del género <i>Cosmos</i>	4
2.2.1 Género <i>Cosmos</i> como flor de ornato	4
2.3 Conservación <i>ex situ</i> del género	5
2.4 Especie y descripción.....	6
2.5 Clasificación taxonómica	7
2.6 Origen y distribución geográfica	7
2.7 Propagación, mejoramiento genético y desarrollo de variedades	7
2.8 Mutagénesis física.....	9
2.8.1 Irradiación gamma	9
2.8.2 Radiosensibilidad y DL50.....	10
2.9 Cultivo <i>in vitro</i>	11
2.9.1 Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales.....	11
2.9.2 Propagación <i>in vitro</i> de plantas	12
2.9.3 Enraizamiento <i>in vitro</i>	12
2.9.4 Auxinas.....	13
2.9.5 Citocininas.....	13
2.9.6 Cultivo <i>in vitro</i> de cosmos chocolate	14
2.9.7 Aclimatación	15
2.10 Efecto de sustratos en la aclimatación de plantas.....	15

2.10.1 Sustratos orgánicos	16
2.10.2 Sustratos inorgánicos.....	16
2.11 Micorrizas en la aclimatación de plantas <i>in vitro</i>	16
2.12 Literatura citada.....	17
3. EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y DE YEMAS AXILARES EN LA OBTENCIÓN Y MULTIPLICACIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i>).....	28
3.1 Resumen	28
3.2 Abstract	29
3.3 Introducción.....	30
3.4 Materiales y métodos	30
3.4.1 Ubicación y obtención de material vegetal	30
3.5 Etapa I. Efecto de las yemas axilares y su posición en el tallo y de reguladores de crecimiento en la obtención y multiplicación de plantas <i>in vitro</i>	31
3.5.1 Diseño experimental	33
3.5.2 Análisis estadístico.....	33
3.6 Resultados y discusión.....	34
3.6.1 Efecto de las yemas axilares y su posición en los tallos en la regeneración y brotación <i>in vitro</i> de cosmos chocolate.....	34
3.6.2 Respuesta de brotación en cosmos chocolate con diferentes reguladores de crecimiento.....	35
3.7 Etapa II. Brotación múltiple de cosmos chocolate mediante el uso de citocininas.....	38
3.7.1 Diseño experimental	39
3.7.2 Análisis estadístico.....	39
3.8 Resultados y discusión.....	39
3.8.1 Brotación múltiple de cosmos chocolate	39
3.9 Conclusiones.....	43
3.10 Recomendaciones.....	44
3.11 Literatura citada	44
4. EFECTO DE AUXINAS EN EL ENRAIZAMIENTO <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i>).....	48
4.1 Resumen	48
4.2 Abstract	49

4.3 Introducción	50
4.4 Materiales y métodos	51
4.4.1 Enraizamiento de cosmos chocolate mediante el uso de auxinas .	51
4.4.2 Callogénesis en cosmos chocolate promovido por auxinas	51
4.5 Diseño experimental.....	52
4.6 Análisis estadístico	52
4.7 Resultados Y discusión	52
4.7.1 Enraizamiento	52
4.7.2 Callo	58
4.8 Conclusión.....	62
4.9 Literatura citada.....	63
5. UTILIZACIÓN DE RADIACIÓN GAMMA Y DETERMINACIÓN DE DL ₅₀ EN YEMAS AXILARES DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i>) EN CULTIVO <i>in vitro</i>	66
5.1 Resumen	66
5.2 Abstract	67
5.3 Introducción.....	68
5.4 Materiales y métodos	69
5.4.1 Irradiación de yemas axilares <i>in vitro</i> mediante rayos Gamma	69
5.5 Diseño experimental.....	71
5.6 Análisis estadístico	71
5.7 Resultados y discusión.....	71
5.7.1 Etapa I.....	71
5.7.2 Etapa II.....	74
5.7.3 Determinación de la DL ₅₀	77
5.8 Conclusión.....	79
5.9 Literatura citada.....	80
6. EFECTO DE SUSTRATOS, RAÍZ Y APLICACIÓN DE MICORRIZAS EN LA ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i>) OBTENIDAS <i>in vitro</i>	85
6.1 Resumen	85
6.2 Abstract	86
6.3 Introducción	87

6.4 Materiales y métodos	88
6.5 Diseño experimental.....	90
6.6 Análisis estadístico	91
6.7 Resultados y Discusión	91
6.7.1 Efecto de diferentes sustratos en la aclimatación de cosmos chocolate.....	91
6.7.2 Efecto de la presencia/ ausencia de raíz durante la aclimatación de cosmos chocolate	92
6.7.3 Efecto de la incorporación de micorrizas en la aclimatación de cosmos chocolate	93
6.7.4 Supervivencia de cosmos chocolate en condiciones de invernadero	94
6.8 Conclusión.....	98
6.9 Literatura citada.....	99

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Cosmos atrosanguineus</i>	7
Cuadro 2. Tratamientos establecidos para la producción de brotación múltiple de cosmos chocolate.	33
Cuadro 3. Respuesta de cosmos chocolate por región para longitud de planta	35
Cuadro 4. Respuesta de cosmos chocolate por región mediante rangos del estadístico de Friedman.....	35
Cuadro 5. Respuesta de cosmos chocolate a los reguladores para longitud de planta	37
Cuadro 6. Respuesta de cosmos chocolate a los reguladores mediante rangos del estadístico de Friedman.....	38
Cuadro 8. Porcentajes de raíz y callo en cosmos chocolate.....	42
Cuadro 9. Resultados de enraizamiento para cosmos chocolate mediante rangos del estadístico de Friedman.	54
Cuadro 10. Porcentajes de emisión de raíces a través de tres fechas.	56
Cuadro 11. Porcentajes obtenidos sobre el vigor de raíces en cosmos chocolate. 0 representa ausencia de raíces.....	57
Cuadro 12. Porcentaje de callo producido en presencia de AIA Y AIB en cosmos chocolate.	59
Cuadro 13. Resultados de ANOVA para la variable diámetro en cosmos chocolate.	59
Cuadro 14. Porcentajes obtenidos para la variable vigor de callo en cosmos chocolate. 0 representa la ausencia.	60
Cuadro 15. Porcentajes respecto a los colores de callo en cosmos chocolate.	61
Cuadro 16. Respuesta de cosmos chocolate a la irradiación Gamma durante la primera etapa.....	73
Cuadro 17. Porcentajes obtenidos de raíz y callo durante la primera etapa....	74
Cuadro 18. Respuesta durante la segunda etapa de cosmos chocolate	76
Cuadro 20. Tratamientos para enraizamiento de cosmos chocolate	88
Cuadro 21. Respuesta de cosmos chocolate a sustratos en la aclimatación de plantas <i>in vitro</i> mediante rangos del estadístico de Friedman	92
Cuadro 22. Respuesta de cosmos chocolate al factor raíz en la aclimatación de plantas <i>in vitro</i> mediante rangos del estadístico de Friedman	93

Cuadro 23. Respuesta de cosmos chocolate a la incorporación de micorrizas en la aclimatación de plantas <i>in vitro</i> mediante rangos del estadístico de Friedman	94
Cuadro 24. Porcentajes de la supervivencia de cosmos chocolate durante la aclimatación.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cosmos atrosanguineus</i>	7
Figura 2. Regiones de planta evaluados; RA= Región apical, R T/I= Región terminal- intermedia, RB= Región basal	32
Figura 3. Respuesta de cosmos chocolate a los 45 días de cultivo. a- testigo; b- Kinetina 3 mg L ⁻¹ ; c- BA 3 mg L ⁻¹ ; d- 2-ip 3 mg L ⁻¹ ; e- necrosamiento de hojas apicales en el tratamiento con 3 mg L ⁻¹ de 2-ip; f- plantas verde claro e iniciación de tejido calloso en el tratamiento con 3 mg L ⁻¹ de BA.	43
Figura 4. Respuesta de enraizamiento en cosmos chocolate. Imágenes correspondientes a la evaluación de 15 días posteriores al establecimiento: a- testigo; b- AIA 0.3 mg L ⁻¹ ; c- AIA 1 mg L ⁻¹ ; d- AIB 0.3 mg L ⁻¹ ; e- AIB 1 mg L ⁻¹ . Evaluación 30 días posteriores: f- testigo; g- AIA 0.3 mg L ⁻¹ ; h- AIA 1 mg L ⁻¹ ; i- AIB 0.3 mg L ⁻¹ ; j- AIB 1 mg L ⁻¹	55
Figura 5. Emisión de raíces en cosmos chocolate; se presenta una tendencia de disminución de enraizamiento conforme pasan los días. El valor 0 indica la ausencia de raíz.....	56
Figura 6. Vigor de raíces en plantas de cosmos chocolate. 0= ausencia de raíz; 1= bajo; 2= medio; 3= alto	58
Figura 7. Vigor de callos en plantas de cosmos chocolate. 0= ausencia de raíz; 1= bajo; 2= medio; 3= alto.	60
Figura 8. Porcentajes de color de callo en cosmos chocolate.	61
Figura 9. Producción de callo por efecto de la adición de auxinas. a- Testigo 0 mg L ⁻¹ ; b- AIA 0.3 mg L ⁻¹ ; c- AIA 1 mg L ⁻¹ ; d- AIB 0.3 mg L ⁻¹ ; e- AIB 1 mg L ⁻¹ . Datos obtenidos a los 60 días.	62
Figura 10. a- explantes irradiados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). b- resiembra de explantes tras la exposición a rayos Gamma.	70
Figura 11. Tendencia de disminución a mayor dosis de irradiación en cosmos chocolate durante la etapa I.....	73
Figura 12. Tendencia de disminución a mayor dosis de irradiación en cosmos chocolate durante la etapa II.....	76
Figura 13. Crecimiento de plantas irradiadas durante la etapa II, 15 días posteriores a su cultivo. a- testigo con crecimiento normal; b- 10 Grays, brote con crecimiento curvo y de menor tamaño; c- 20 Grays, crecimiento de masa celular indiferenciada (lado izquierdo); d- 30 Grays, encapsulamiento de brotes; e- 40 Grays, crecimiento retardado de brotes.	77

Figura 14. Dosis Letal Media (DL50) para la supervivencia de cosmos chocolate.	79
Figura 15. a- separación de plantas con presencia/ausencia de raíz; b- primer día de aclimatación con luz indirecta dentro del laboratorio; c- 12 días, plantas completamente destapadas con mayor luz directa; d- 15 días, plantas en condiciones de invernadero.	90
Figura 16. Enraizamiento de cosmos chocolate transcurrido un mes de aclimatación. a- T2; b- T3; c- T4; d- T11.	97
Figura 17. Plantas de cosmos chocolate aclimatadas con éxito posterior a dos meses y medio. a-T1; b- T4; c- T5; d-T11.	98

DEDICATORIA

A mis padres, Mario y Luisa por ser mi ejemplo, por su apoyo incondicional en cada etapa y por siempre creer en mí.

A la memoria de mi abuelo, por su cariño, alegrías y el ejemplo que dejó.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) por abrirme las puertas para llevar a cabo mi investigación dentro de sus instalaciones.

A la Dra. Ma Teresa Martínez Damián por recibirme y brindarme su dirección, tiempo y apoyo a lo largo de este trabajo.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por compartirme sus conocimientos, guiarme en todo momento y aconsejarme.

A la Dra. María Teresa Beryl Colinas y León por la colaboración en la revisión de este trabajo y la atención brindada.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por su tiempo, apoyo y asesoría para el análisis de este trabajo.

Al M. C. José Merced Mejía Muñoz por facilitarme el material vegetal para la investigación

Al Dr. Eulogio de la Cruz Torres por el recibimiento y apoyo en el ININ para la irradiación de plantas.

A la Lic. Itzel Nayelli Silvestre González por el apoyo y asesoría en el trabajo de laboratorio, además de su amistad.

A la Lic. Gisela García de la Rosa por la ayuda, consejos y disponibilidad en todo momento en el laboratorio.

A mis compañeros del posgrado por la compañía durante el proceso, en especial a Fernanda por su amistad y apoyo en todo momento.

A mi familia y amigos que han estado en todas las circunstancias con un cariño incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Rosa Isela Martínez Contreras

Fecha de nacimiento: 16 de junio de 1996

Lugar de nacimiento: Zapopan, Estado de Jalisco, México

CURP: MACR960616MJCRNS08

Profesión: Licenciada en Biología

Cédula: 12968499



Desarrollo académico

Bachillerato: Escuela preparatoria No. 9 de la Universidad de Guadalajara

Licenciatura: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara

CULTIVO *in vitro* Y EFECTO DE RADIACIÓN GAMMA EN COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*)

RESUMEN GENERAL

Cosmos atrosanguineus, o cosmos chocolate, es una especie perteneciente al grupo de las asteráceas considerada endémica de México y con escasas poblaciones en su ambiente natural. Posee características particulares como el color marrón rojizo de sus flores y el aroma característico a chocolate. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo *in vitro* exitoso, al promover las etapas tanto de brotación, multiplicación, y enraizamiento, así como su aclimatación; yemas axilares obtenidas *in vitro*, se expusieron a los efectos de la irradiación Gamma para promover la aparición de variantes o de mutaciones. En la obtención de brotes *in vitro*, se presentaron respuestas positivas empleando la región terminal-intermedia de los tallos y el uso de 3 mg L⁻¹ de BA para generar el mayor número de 78.34 brotes. En el enraizamiento el efecto de la auxina AIB en concentración de 0.3 mg L⁻¹ generó diferencias evidentes con un mayor número y longitud de raíz comparado con el medio de cultivo sin la presencia de reguladores, por otra parte, el AIA en concentración de 0.3 mg L⁻¹ promovió la formación de callos *in vitro* mostrando como resultado el mayor diámetro de 1.10 cm. En los resultados de la aplicación de irradiación de los brotes obtenidos *in vitro*, se observó una correlación entre mayor dosis y la disminución de la supervivencia de plantas por lo que la Dosis Letal Media (DL₅₀) se determinó en la exposición a 20 Grays. En la etapa final de aclimatación el tipo de sustrato y el uso de micorrizas no influyó en el crecimiento ni supervivencia de plantas, aunque si destacó la importancia del enraizamiento en la etapa *in vitro* para que las plantas logaran un buen desarrollo en condiciones de invernadero.

Palabras clave: aclimatación, cosmos chocolate, cultivo *in vitro*, enraizamiento, irradiación.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Rosa Isela Martínez Contreras
Directora: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

GENERAL ABSTRACT

***in vitro* CULTIVATION AND EFFECT OF GAMMA RADIATION ON CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus*)**

Cosmos atrosanguineus, or chocolate cosmos, is a species belonging to the Asteraceae family, considered endemic to Mexico, with scarce populations in its natural habitat. It has unique characteristics, such as the reddish-brown color of its flowers and its distinctive chocolate scent. The objective of this study was to establish a successful *in vitro* protocol, promoting the stages of sprouting, multiplication, and rooting, as well as acclimatization. Axillary buds obtained *in vitro* were exposed to the effects of Gamma irradiation to promote the appearance of variants or mutations. For *in vitro* shoot induction, positive responses were observed using the terminal-intermediate region of the stems and applying 3 mg L⁻¹ of BA, which generated the highest number of shoots (78.34). In the rooting stage, the effect of the auxin IBA at a concentration of 0.3 mg L⁻¹ produced significant differences, with a higher number and greater root length compared to the culture medium without growth regulators. On the other hand, IAA at a concentration of 0.3 mg L⁻¹ promoted callus formation *in vitro*, resulting in the largest callus diameter 1.10 cm. Regarding the effects of irradiation on *in vitro* shoots, a correlation was observed between higher radiation doses and decreased plant survival. Consequently, the median lethal dose (LD₅₀) was determined to be 20 Grays. In the final acclimatization stage, the type of substrate and the use of mycorrhizae did not influence plant growth or survival. However, the importance of proper *in vitro* rooting was highlighted as a key factor for successful plant development under greenhouse conditions.

Keywords: acclimatization, chocolate cosmos, *in vitro* cultivation, rooting, irradiation.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Rosa Isela Martínez Contreras
Advisor: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Cosmos* pertenece a la familia Asteraceae y se distribuye en América, desde Estados Unidos de América hasta el sur de los Andes, sin embargo, cabe destacar que México tiene la mayor riqueza ya que el 97% de sus especies se encuentran dentro del país (Vargas-Amado et al., 2013; Vargas-Amado et al., 2020). *Cosmos chocolate* (*Cosmos atrosanguineus* Sheff) es una especie endémica de México, que anteriormente se llegó a reportar como extinta en estado silvestre, sin embargo, ha sido encontrada en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí (Castro-Castro, et al., 2014). Particularmente, dentro del estado de Hidalgo, México, en 2015 se colectaron plantas silvestres de esta especie (Gómez-Pedraza et al., 2019). A pesar de ser una especie endémica, es desconocida en México y es considerada como amenazada por actividades antropogénicas que han afectado su hábitat natural. Hasta la fecha no se reporta un manejo agronómico bien establecido de esta planta, tampoco existe algún registro de su explotación comercial (Gómez-Pedraza et al., 2024). Entre las características más destacables propias de cosmos chocolate, se encuentran el color y el olor, ya que sus capítulos van desde tonos violetas a marrón rojizo oscuro y desprenden un particular aroma a chocolate (Hind & Fay, 2003).

Debido a que se trata de una planta autoincompatible, refleja un bajo porcentaje de variabilidad, y se ha planteado como alternativa para su propagación el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, aceptando que únicamente se preserva un ejemplar en el Real Jardín Botánico Kew. en Inglaterra. En el área de la biotecnología vegetal, se han reportado avances en cuanto a su micropropagación, enraizamiento y criopreservación. Con base en lo anterior, contar con un protocolo de cultivo *in vitro* permitiría la obtención de un mayor número de clones, así como contribuir en su conservación. Además, promover la variabilidad

genética a través de la aplicación de radiación Gamma como agente mutagénico puede ser útil en futuras investigaciones asociadas a su mejoramiento genético.

1.1 Objetivo general

Establecer un protocolo *in vitro* que permita la obtención y multiplicación de plantas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*). Y evaluar el efecto de la radiación Gamma, así como la identificación de Dosis Letal Media (DL₅₀) en la variabilidad de plantas recuperadas *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la posición de yemas axilares en la planta (apical, terminal-intermedia y basal) que en conjunto con reguladores de crecimiento presenta la mejor regeneración de plantas de cosmos chocolate *in vitro*
- Comparar diferentes citocininas y su eficiencia para promover una mayor generación de brotes *in vitro* en cosmos chocolate
- Observar el efecto de diferentes concentraciones de auxinas en el enraizamiento de plantas *in vitro* de cosmos chocolate
- Evaluar el efecto del uso de auxinas en la formación de callo *in vitro* de cosmos chocolate
- Definir la influencia de algunas dosis de radiación Gamma y obtener la DL₅₀ en yemas axilares *in vitro* mediante la supervivencia de plantas de cosmos chocolate
- Cuantificar la supervivencia de plantas de cosmos chocolate *ex vitro* por efecto de diferentes sustratos, raíz y aplicación de micorrizas

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La floricultura en México

La floricultura ha formado parte de la cultura mexicana desde hace siglos, sin embargo, en 1980 la visión de esta actividad se transforma en una más comercial para obtener mayores ganancias (Villanueva et al., 2017). Se trata de una actividad importante dentro del sector agrícola que genera más de 250 mil empleos directos y casi un millón de indirectos. El 20% de la producción nacional de flores es destinada a la exportación y se valora en alrededor de 44 mil millones de dólares americanos anuales; dentro de los productos que se consideran parte de la floricultura se encuentran además de la flor de corte, otros productos como plantas vivas, bulbos, cebollas, tubérculos, raíces tuberosas, turiones, rizomas, esquejes, injertos, flores y capullos, follaje, hojas, ramas, hierbas, musgos y líquenes. Es importante considerar todos los productos que se incluyen dentro de esta disciplina ya que, en el intercambio comercial de México, se muestran cambios constantes a lo largo del tiempo tanto en exportaciones como importaciones de este material. Existen registros que muestran que la flor de corte representa casi la mitad de los productos exportados a comparación del material vegetativo que suele utilizarse como insumo para cultivo, por lo que particularmente para las exportaciones de México se prefieren los productos terminados. Por el contrario, las importaciones realizadas por el país son principalmente de insumos de todo tipo para cultivo mientras que la adquisición de producto terminado es baja (Ramírez & Avitia-Rodríguez, 2017; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022). México cuenta con una diversidad de climas que representan una ventaja en la creación de un fuerte potencial para la producción de diversos cultivos florícolas y su mercado se ve beneficiado por su cercanía con Estados Unidos y Canadá (García & Companioni, 2019). El país genera alrededor de 41 clases de flores ornamentales con una superficie anual aproximada de 14 mil 750 hectáreas distribuidas en 20 entidades en las que

mayormente se encuentran cultivos de crisantemo, rosa y gladiola por la derrama económica que representan (Díaz & Martínez, 2023).

La producción a gran escala para el mercado se encuentra en el centro del país; entre los estados con mayor participación porcentual se encuentran el Estado de México con el 61.4%, Puebla con 14.5%, Morelos con 7.6%, Distrito Federal con 3.8%, Jalisco con 3.2%, Michoacán con 2.6%, Baja California con 2.1% y el resto del país representa el 4.8% (Ramírez & Avitia-Rodríguez, 2018). El estado de México es considerado como el principal productor de flor de corte del país ya que aquí se concentra el “corredor florícola” integrado por los municipios de Tenancingo, Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Tonatico, Zumpahuacán y Villa Guerrero (Tejeda-Sartorius et al., 2015).

2.2 Potencial en la floricultura y conservación del género *Cosmos*

2.2.1 Género *Cosmos* como flor de ornato

Las especies ornamentales poseen cualidades estéticas relacionadas con la forma, estructura de la planta, flores o frutos dependiendo del interés decorativo y son utilizadas para el adorno de entornos inmediatos. Actualmente en México se considera que existen 4220 especies con potencial ornamental de las cuales 3434 son nativas y 786 introducidas (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2020). El género *Cosmos* agrupa 34 especies de las cuales la mayoría se encuentran en México. Entre los mayores atractivos del género destacan las inflorescencias que posee ya que son muy vistosas, encontrando una variedad de colores como rosa, amarillo, anaranjado y púrpura que son característicos de cada especie del género. Particularmente *Cosmos atrosanguineus* conocido como cosmos chocolate, además de poseer colores rojizos-marrones, presenta un peculiar aroma a chocolate que se desprende de sus flores. Estas características, resultan favorables para considerarse plantas de ornato; sin embargo, *C. atrosanguineus* es una especie poco cultivada en México comparado con otros países donde se suelen sembrar plantas ornamentales

cada año (Rodríguez et al., 2006). Se considera que cosmos chocolate también cuenta con potencial ornamental ya que ha sido mejorado genéticamente en algunos países como Nueva Zelanda, Japón y Estados Unidos, sin embargo, en México no existe un manejo agronómico establecido ni un registro para su comercialización (Gómez- Pedraza et al., 2024).

2.3 Conservación ex situ del género

Existen algunas especies como *Cosmos jaliscensis*, Sherff, *C. juxtlahuacensis* Panero et Villaseñor, *C. longipetiolatus* Melchert, *C. mattfeldii* Sherff, *C. nelsonii* B. L. Rob et Fernald y *C. sherffii* Melchert que poseen una distribución geográfica restringida, sin embargo, no se incluye ninguna de ellas en la lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana Nom-059-Semarnat-2010 y tampoco en la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2010) (Vargas-Amado et al., 2013). *Cosmos atrosanguineus* tampoco se presenta en ninguna categoría de riesgo a pesar de que anteriormente las poblaciones de hábitat silvestre habían sido reportadas como extintas. Sin embargo, de manera informal se sigue considerando como una especie amenazada por las actividades antropogénicas en su hábitat natural (Gómez- Pedraza et al., 2024). Su conservación ha sido a través de un clon que se ha propagado con propósitos ornamentales en el Real Jardín Botánico de Kew en Londres, Reino Unido. Además, el Real Jardín Botánico promueve que su hábitat natural en México sea restaurado (Oku et al., 2008; Fay, 1993). Otra de las maneras en las que se ha preservado material ha sido a través de la criopreservación de brotes, ya que ésta es considerada una técnica idónea para el caso particular de especies raras y en peligro de extinción (Wilkinson et al., 2003). Existe una población encontrada en 2015 en Zimapán, Hidalgo, México de la cual también se ha realizado una conservación del material vegetal a través del cultivo *in vitro* y la germinación de semillas en la Universidad Autónoma Chapingo (Morales-Vázquez et al., 2022). En exploraciones botánicas llevadas a cabo en el estado de San Luis Potosí, México, el equipo del Herbario Isidro Palacios de la UASLP ha registrado la presencia de *Cosmos*

atrosanguineus (Hook.) Voss y algunos ejemplares son resguardados en la colección del herbario SLPM (De- Nova et al., 2018).

2.4 Especie y descripción

Se considera que *Cosmos atosanguineus* pertenece a la sección Discopoda debido a las características que posee; presenta un hábito herbáceo perenne, con raíces tuberosas y cabezuelas con 8 a 10 flores liguladas. Sus flores van del color rojo oscuro al marrón y poseen una característica fragancia a chocolate. Estas plantas no producen semillas ya que son estériles (Vargas-Amado et al., 2013; Kozak et al., 2016). Cuenta con tubérculos pequeños de 3 cm de largo por 1.5 a 3 cm de diámetro. Posee pocos tallos ascendientes a deflexos. Sus brotes jóvenes presentan hojas pecioladas simples; las hojas posteriores son pinnadas con 2 a 3 pares de foliolos. Tiene inflorescencias que presentan capítulos terminales y axilares solitarios sobre pedicelos alargados de 35 a 50 cm y de 2 a 4 mm de diámetro; presenta capítulos de aproximadamente 4 cm y posee un receptáculo que va de plano a convexo. Su fruto es un aquenio de 13 a 20 mm de largo. Es una planta hermafrodita que posee 40 flores tubulares y presenta abundante polen amarillo. Las anteras sobresalen del tubo de la corola y sus tecas son color marrón negruzco (Hind & Fay, 2003).

2.5 Clasificación taxonómica



Figura 1. *Cosmos atrosanguineus*

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Cosmos atrosanguineus*

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Coreopsideae
Género	<i>Cosmos</i>
Especie	<i>Cosmos atrosanguineus</i>

2.6 Origen y distribución geográfica

Es una especie nativa y endémica de México. Su distribución va del Centro-Este de México desde San Luis Potosí y hacia el Sureste hasta Hidalgo; En 2015 se reportó de manera específica una población silvestre en Zimapán, Hidalgo, México. El tipo de hábitat en el que se encuentra es de bosques de roble y pino. (Hind & Fay, 2003; Gómez-Pedraza et al., 2019). De acuerdo con Vargas-Amado et al. (2013) han sido localizados algunos ejemplares de la especie en los estados de Guanajuato, Hidalgo y Querétaro. Además, también de manera particular, se han reportan hallazgos en los municipios de Tierra Nueva, Rioverde y Santa María del Rio en el Estado de San Luis Potosí (De-Nova et al., 2018).

2.7 Propagación, mejoramiento genético y desarrollo de variedades

Una de las principales problemáticas del clon de cosmos chocolate resguardado es que no produce semillas por lo que no presenta propagación sexual; por lo tanto, su propagación se lleva a cabo de manera vegetativa. La principal alternativa es realizar la división de tubérculos, sin embargo, es una opción muy lenta por lo que se recurre a otras alternativas más rápidas como

el cultivo in vitro (Kozak et al., 2016). De manera tradicional, en esta especie se han llevado a cabo múltiples trabajos en la generación de cultivares híbridos; entre algunos de ellos se pueden mencionar el cultivar “Choco Mocha” y algunos cultivares como “Brown Rouge”, “Forte Rouge”, “Rouge Rouge” y “Noel Rouge” que han sido obtenidos de las cruzas entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos sulphureus* (Amamiya & Iwashina, 2016). Nueva Zelanda es uno de los pioneros en la generación de variedades ya que han producido otros cultivares importantes de la especie como “Kew Clone”, “Black Beaty”, “Black Magic”, “Coco Chanel” y “Dark Secret” (Rice, 2017). En 1997 fue aceptado el cultivar “Pinot Noir” creado a través de una selección de semillas antes de la pérdida de este carácter y desde entonces ha sido una de las principales fuentes de múltiples selecciones nuevas (Poulter & Butler, 2018). Existen otros trabajos en hibridaciones llevadas a cabo entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos sulphureus* en donde se llegó a obtener un fenotipo intermedio mediante el rescate de embriones (Oku et al., 2008). Como se menciona, el material obtenido del clon cuenta con patentes que son utilizadas para flores de ornato principalmente en Europa; sin embargo, en México también se ha buscado el mejoramiento genético que permita la obtención de variedades para su registro y comercialización. Se han realizado cruzas entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus* para la generación de híbridos, los cuales han resultado exitosos con un intercambio genético de las dos especies (Gómez-Pedraza et al., 2019). En México, los trabajos realizados en el programa de mejoramiento genético y conservación de la especie de la Universidad Autónoma Chapingo, han logrado la obtención y registro de dos variedades de cosmos chocolate, la primera denominada “Dulce Amanecer” proveniente de la selección de plantas de la población silvestre colectada en 2015; la segunda, una variedad híbrida resultado de una crusa dirigida y controlada entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus* llamada “Doble Sensación” (Morales-Vázquez et al., 2024; Gómez-Pedraza et al., 2023).

2.8 Mutagénesis física

2.8.1 Irradiación gamma

Las mutaciones son aquellos cambios en la composición genética que sufre un individuo y que son heredados a la progenie y como resultado se da la aparición de nuevos caracteres. Existen algunos agentes de tipo químico y físico para este propósito; dentro de los agentes físicos mutagénicos se encuentran los rayos gamma que cuentan con una monoenergía obtenida generalmente de radioisótopos. Estos rayos tienen una longitud de onda menor a 10 nm y con ello se provocan mutaciones en el ADN. Dentro de las mutaciones provocadas se pueden encontrar deleciones, inversiones, duplicaciones y traslocaciones. El isótopo Cobalt-60 es una de las principales fuentes de rayos gamma, posee una vida media de 5.26 años y debido a que es altamente penetrante y cuenta con una alta energía que causa daños en el tejido orgánico al interactuar con ella, por seguridad, siempre debe estar protegido en contenedores de plomo. Los daños que se producen al aplicar esta radiación pueden ser directos a las macromoléculas o de manera indirecta como sucede frecuentemente a través de la radiólisis del agua (Kitano et al., 2015; Van de Walle et al., 2016; Spencer-Lopes et al., 2021).

Entre los principales beneficios de la irradiación con fines de mejoramiento se encuentra el desarrollo de nuevas variedades de plantas con características mejoradas en diferentes aspectos, entre ellos, se pueden encontrar la resiliencia al clima, el rendimiento, tiempo de maduración y la resistencia a plagas y enfermedades; sin embargo, también ha sido aceptado para el aumento de diversidad genética en las plantas (Udage, 2021). Se ha demostrado que esta vía de mejoramiento es adecuada en plantas ornamentales ya que se han producido aproximadamente 720 cultivares mutantes espontáneos e inducidos (Yamaguchi, 2018). Los principales usos que se le ha dado a la irradiación en el ámbito agrícola se centran prioritariamente en especies de importancia alimenticia y en la generación de variedades en especies ornamentales; sin embargo, esta tecnología puede

llegar a ser utilizada como una herramienta en casos específicos de especies nativas y exóticas del país proporcionando mejores adaptabilidades, por lo que las tecnologías nucleares pueden ser usadas para programas de conservación genética con una aplicación en aquellas especies que se consideran vulnerables o cercanas a la extinción (Rojas et al., 2018).

Este proceso de fitomejoramiento, además, se relaciona directamente con la micropropagación ya que aquí se permite producir grandes cantidades de explantes, material importante tanto para la inducción de mutaciones como para el desarrollo posterior de líneas mutantes (Sarsu et al., 2021). En muchas ocasiones el material que se somete a mutagénesis previamente se ha establecido *in vitro* debido a que esta técnica permite un mejor manejo y control de condiciones fisicoquímicas del material vegetal (Rubio-Ochoa et al., 2024).

2.8.2 Radiosensibilidad y DL₅₀

Dentro de los programas de mejoramiento genético por mutagénesis inducida mediante radiación gamma, se necesita determinar la dosis donde la probabilidad de éxito sea mayor y esto se asocia directamente a la dosis letal (Gálvez-Marroquín et al., 2023).

El estudio de la radiosensibilidad que presenta la especie que se somete a mutaciones inducidas permite observar el efecto sobre el material vegetal y favorece la definición de la dosis adecuada (Madriz-Martínez et al., 2022). La radiosensibilidad determina la dosis más eficaz en el incremento de frecuencia de mutaciones y dentro de este estudio la Dosis Letal Media (DL₅₀), es uno de los principales parámetros que se evalúan. La DL₅₀ es la dosis en la que se reduce la supervivencia y el crecimiento al 50% en relación con el tratamiento control y en la que se obtiene la mayor cantidad de mutaciones (Hernández-Muñoz et al., 2019). Particularmente en el caso de cortes *in vivo* o *in vitro* y callos embriogénicos se requieren dosis más bajas comparadas con las aplicadas a semillas (Deshpande et al., 2010).

2.9 Cultivo *in vitro*

2.9.1 Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos vegetales (CTV) es un método de propagación de plantas en el que se utilizan células, tejidos, protoplastos u órganos vegetales bajo condiciones controladas (Irsyadi, 2021). Su fundamento se basa en la teoría de la totipotencia celular, que posibilita la obtención de plantas a partir de cualquier célula viva bajo condiciones controladas. (Cedres et al., 2015). Se trata de una herramienta que permite estudiar, propagar, conservar y hacer propuestas de aprovechamiento sustentable en especies de interés comercial y plantas que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo y por consiguiente permite reproducir y conservar la riqueza biológica para asegurar la existencia de futuras generaciones (Sánchez, 2022). Es un procedimiento que no crea procesos nuevos de crecimiento ya que solo se encarga de dirigir y ayudar al potencial de regeneración y multiplicación que poseen las plantas haciéndolo de una manera eficaz al ocupar menos espacio y tiempo del que se requiere con un procedimiento de propagación vegetativa convencional (Aguirre et al., 2016). Dentro del cultivo *in vitro* es fundamental el establecimiento de protocolos completos que garanticen el éxito de los procedimientos para las especies que se trabajan ya que de acuerdo con determinada especie o genotipo la variabilidad en los factores fisiológicos y requerimientos de crecimiento son diferentes (Isah, 2015). Las etapas principales que comprende el CTV son propagación, enraizamiento y aclimatación de plantas (Resende et al., 2015). Una de las ventajas que ofrece esta tecnología es la obtención de plantas completamente libres de patógenos, sin embargo, para que el proceso de obtención de plantas sea exitoso se requieren de ciertos elementos. Debido a que las plantas responden fácilmente a estímulos, se incluyen factores indispensables, entre los que se encuentra la elección de la fuente de explante, el medio de cultivo con constituyentes nutricionales orgánicos e inorgánicos, la incorporación de

reguladores de crecimiento, el pH óptimo y las condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (Cedres et al., 2015; Pierik, 1994).

2.9.2 Propagación *in vitro* de plantas

La etapa de inducción de brotación múltiple *in vitro* a partir de un mismo explante es fundamental ya que de aquí se obtendrá un gran número de plantas.

Es importante considerar que células vegetales no regeneran fácilmente brotes por lo que es necesario utilizar medios de cultivo específicos para inducción de brotación; en el caso de regeneración directa *in vitro* las células somáticas en primera instancia deben responder a los reguladores para que posteriormente las células comiencen la división celular y finalmente se produzcan los nuevos brotes que darán lugar a plantas completas (Bidabadi & Jain, 2020). Mayormente en esta etapa se hace uso de citocininas o combinaciones ya que con esto la obtención masiva es más efectiva (Medina et al., 2015).

2.9.3 Enraizamiento *in vitro*

La producción de raíces de forma natural es controlada por medio de hormonas, su forma de acción es a través de movimientos de tipo basipétalo por el floema para concentrarse en la base (López et al., 2016).

La micropropagación requiere de la iniciación de raíces *in vitro* ya que de esta manera se les otorgan ventajas a las plantas para que la etapa de aclimatación sea exitosa (Abdalla et al., 2022). En la búsqueda de obtención y desarrollo de raíces, generalmente se hace uso de reguladores de crecimiento del grupo de las auxinas ya que a pesar de que en algunas especies el enraizamiento es espontáneo, la inducción en otras ocasiones se encuentra influenciada por la presencia de reguladores en los medios de cultivo y se puede llegar a generar casi el doble de densidad de raíces en las plantas (García et al., 2015; Bettoni et al., 2024).

2.9.4 Auxinas

Las auxinas tienen participación durante todo el ciclo de vida de las plantas y se distribuyen diferencialmente dentro de los tejidos dando lugar a diferentes procesos morfogénicos (Garay-Arroyo et al., 2014). Son hormonas que se encuentran relacionadas principalmente con la elongación, división celular, diferenciación de tejidos, respuesta a la luz-gravedad y producción de raíces adventicias (Vega-Celedón et al., 2016). El ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (PAA) son las cuatro auxinas sintetizadas de manera endógena por las plantas. Entre las auxinas sintéticas más utilizadas destacan el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftaleno-1-acético (NAA) (Simón & Petrášek, 2011).

2.9.5 Citocininas

Las citocininas son hormonas derivadas de la adenina y su aparición se remonta a los años 1940 y 1950; su transporte se lleva a cabo principalmente por el xilema vegetal dirigido hacia las partes aéreas de la planta (Alcantara-Cortes et al., 2019). Estas hormonas son esenciales para diversos procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas. Existen dos tipos de citocininas: las naturales y las artificiales. Naturalmente son generadas a partir de DMAPP (vía del ácido mevalónico) y 5'-AMP; son sintetizadas principalmente en la raíz, meristemos apicales y semillas inmaduras. Entre las principales citocininas artificiales se encuentran la benciladenina (BA) y la furfurilaminopurina (kinetina). Los principales efectos se relacionan con la capacidad de estimular la división y la diferenciación celular por lo que en el cultivo *in vitro* se utiliza para propagación clonal de material ornamental; entre los efectos destacan la inducción de organogénesis, formación de brotes adventicios y embriones somáticos (Jordan & Casaretto, 2006; Kakimoto, 2003). El 2iP N⁶-(2-isopentenil)-adenina también ha sido ampliamente utilizado ya que en el cultivo de tejidos muestra una respuesta positiva en la

producción de mayores cantidades de brotes, raíces y hojas (Karyanti et al., 2021).

2.9.6 Cultivo *in vitro* de cosmos chocolate

Debido a la baja variabilidad y alta incompatibilidad de la especie, el uso de la biotecnología y el Cultivo de Tejidos Vegetales es frecuentemente utilizado para su reproducción vegetativa. Existen trabajos de micropropagación tanto en plantas obtenidas del clon del Real Jardín Botánico de Kew como de los ejemplares silvestres colectados en 2015 en Zimapán, Hidalgo, México. Entre los que se han realizado con el clon de Kew, existen investigaciones en la influencia de diferentes colores de luz y reguladores para el crecimiento de brotes axilares (Kozak et al., 2016). También se ha evaluado el efecto de BA a diferentes concentraciones al utilizar como explante puntas de brotes y nudos para la regeneración de brotes axilares (Kozak et al., 2016). La orientación y el tipo de explante, así como la eliminación de hojas se han estudiado en combinación con BA para la producción de brotes y se demostró que la remoción de hojas y una colocación de manera vertical es efectiva para generar una mayor cantidad; la misma citocinina se ha evaluado en combinación con diferentes solidificantes y tipos de medio de cultivo para conocer la influencia que estos presentan en el desarrollo de la planta (Kozak et al., 2013; Kozak et al., 2013). Otro de los estudios realizados para la especie, reportado por Hosoki et al. (2003) consistió en la micropropagación mediante secciones de tallo con nudos y la aplicación de BA, lo cual logró una tasa de multiplicación óptima de 3.7 brotes, además, de obtener el enraizamiento mediante el uso de IBA y posteriormente la aclimatación del 93% de este material obtenido en condiciones *in vitro*.

Por otra parte, el material silvestre ha sido utilizado en trabajos de micropropagación a partir de explantes nodales en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con resultados exitosos en la cantidad de material obtenido para su posterior caracterización morfológica (Morales-Vázquez et al., 2022). Algunas otras etapas que han sido evaluadas *in vitro* ha sido la obtención de

callos a través de segmentos nodales y foliares; la organogénesis directa a través de explantes nodales y el enraizamiento de las mismas plantas (Gómez-Pedraza et al., 2019).

2.9.7 Aclimatación

La aclimatación es el proceso que presenta un ser orgánico de adaptación a un cambio climático o a nuevas condiciones de vida que se le imponen, implica que el organismo se adapte fisiológicamente a los cambios en su entorno natural; esto sucede durante un periodo corto de tiempo dentro de la vida del organismo (Montes et al., 2016). En el cultivo *in vitro*, la aclimatación es la etapa final que garantiza el éxito del cultivo de tejidos ya que en este proceso las plantas pueden dejar de crecer o morir, por lo que es necesaria la aplicación de diferentes estrategias que eviten estos problemas (Irsyadi, 2021). En esta etapa es llevado a cabo un acondicionamiento gradual de las plantas que son colocadas en un entorno *ex vitro*, el cual se realiza mediante el incremento progresivo de humedad relativa y luz, así, se facilita la supervivencia de plántulas jóvenes y fisiológicamente sensibles. Esta adaptación gradual permitirá que se desarrolle un sistema radicular completo y favorece el control de la transpiración estomática y cuticular (da Silva et al., 2017).

2.10 Efecto de sustratos en la aclimatación de plantas

Se le denomina sustrato al material distinto del suelo tanto natural como de síntesis, residual, mineral, u orgánico que se coloca en contenedores y permite el anclaje del sistema radical de la planta dándole soporte. Provee agua y nutrimentos y permite el intercambio gaseoso desde y hacia la raíz (Villegas et al., 2017). Los sustratos cuentan con características físicas y químicas propias dependiendo de las combinaciones y proporciones en las que son utilizados y esto es fundamental para un correcto desarrollo y crecimiento de las plantas (Mixquititla-Casbis et al., 2022).

2.10.1 Sustratos orgánicos

Se clasifican en: Naturales; de descomposición biológica como la turba o tierra de monte. Sintéticos; como la espuma de poliuretano y residuos o subproductos como el aserrín, el estiércol, la cascarilla de arroz y el polvo de coco (Villegas et al., 2017; Bunt, 1988; Hitchon et al., 1990).

2.10.2 Sustratos inorgánicos

Los de origen natural son obtenidos de rocas o minerales ígneos, metamórficos o sedimentarios como la arena, grava y tezontle; los tratados industrialmente tienen el mismo origen que los naturales pero han sido sometidos a procesos para obtener materiales más ligeros y porosos como la perlita o la vermiculita y también de residuos provenientes de la industria, como la obtención de carbón (Villegas et al., 2017; Bunt, 1988; Hitchon et al., 1990).

2.11 Micorrizas en la aclimatación de plantas *in vitro*

El termino micorrizas hace referencia a la asociación simbiótica entre un hongo micorrízico y las raíces de una planta; una característica importante es que tienen la capacidad de extenderse más allá de la zona de raíces con lo que se forma una red de micelio con capacidad de explorar el suelo y gracias a ello, entre los beneficios que se obtienen de esta relación, se encuentra el intercambio de fotosintatos por nutrientes y la planta obtiene una mejor resistencia a patógenos y estrés (Carrillo-Saucedo et al., 2022; Rivillas et al., 2019). Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) además son ampliamente utilizados en plantas debido a que ayudan a reducir la pérdida de material vegetal en procesos que se consideran críticos como la aclimatación y adaptación de algunas especies (Ramírez et al., 2018). En la agricultura sostenible tienen uso como fertilizantes orgánicos. Algunos de los géneros más comunes para la colonización son los géneros *Glomus*, *Acaullospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*, sin embargo, su uso depende de las características del suelo para facilitar su asociación. La combinación de

algunos de estos géneros ha demostrado que puede llegar a tener un efecto positivo en la colonización de algunas especies (Garzón, 2016; Bernal-Monterrosa & Cabrales-Herrera, 2022).

2.12 Literatura citada

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8(8), 1-28. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Aguirre, V. G., Calle, M. & Baudoin, J. P. (2016). Aspectos Generales del Cultivo in vitro. En VG Aguirre, JP Baudoin & AL Leigue (Eds.), *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* (pp. 29-33). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias.
- Alcantara-Cortes, J. S., Acero, G. J., Alcántara, C. J. D., & Sánchez, M. R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Amamiya, K., & Iwashina, T. (2016). Qualitative and Quantitative Analysis of Flower Pigments in Chocolate Cosmos, *Cosmos atrosanguineus*, and its Hybrids. *Natural Product Communications*, 11(1), 77-78. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100122>
- Bernal-Monterrosa, M. Á., & Cabrales-Herrera, E. M. (2022). Respuesta del banano clon Valery en alta densidad a la inoculación con micorrizas y fósforo en Apartadó-Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 25(2), 1-9. <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n2.2022.1659>

- Bettoni, J. C., Wang, M. R., & Wang, Q. C. (2024). In Vitro Regeneration, Micropropagation and Germplasm Conservation of Horticultural Plants. *Horticulturae*, 10(1), Article 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010045>
- Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants*, 9(6), Article 702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Bunt, AC. (1988). MEDIA AND MIXES FOR CONTAINER-GROWN PLANTS (2.^a ed.). Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-7904-1>
- Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., & Cruz-Ortega, R. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta Botánica Mexicana*, (129), 1-27. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>
- Castro-Castro, A., Vargas-Amado, G., Harker, M., & Rodríguez, A. (2014). Análisis macromorfológico y citogenético del género *Cosmos* (Asteraceae, Coreoideae), con una clave para su identificación. *Botanical Sciences*, 92(3), 363-388. <https://doi.org/10.17129/botsci.111>
- Cedres, G. M. & Sharry S. (2015). INTRODUCCIÓN. En S. Sharry, M. Adema, & W. Abedini (Eds.), *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 6-12). Universidad Nacional de la Plata. <http://rid.unrn.edu.ar:8080/handle/20.500.12049/2366>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2020). Ornamental. <https://biodiversidad.gob.mx/diversidad/ornamental>
- da Silva, J. A. T., Hossain, M. M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Songjun, Z. (2017). Acclimatization of *in Vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>

- De-Nova, J. A., Castillo-Lara, P., Gudiño-Cano, A. K., & García-Pérez, J. (2018). FLORA ENDÉMICA DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ Y REGIONES ADYACENTES EN MÉXICO. *Árido-Ciencia*, 3(1), 21-41.
- Deshpande, K. N., Mehetre, S. S., & Pingle, S. D. (2010). Effect of different mutagens for induction of mutations in mulberry. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(2), 104-108.
- Díaz, D., & Martínez, J. (2023). Análisis sobre el desarrollo del sector florícola en el ejido Llano de La Lima, Tapachula, Chiapas. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 52(1), 369-376. [10.22004/ag.econ.337033](https://doi.org/10.22004/ag.econ.337033)
- Fay, M. F. (1993). SOS to return cosmos to Mexico. *Plant Heritage*, 3, 22.
- Gálvez-Marroquín, L. A., Avendaño-Arrazate, C. H., Ariza-Flores, R., Gomez-Simuta, Y., Martínez-Bolaños, M., & Cruz-López, J. A. (2023). Radiación gamma en semillas de Jamaica para inducir variación morfológica y selección de mutantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(5), 27-37. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i5.3010>
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica*, 33(1), 13-22. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=74549>
- García V. R., & Companioni, G. B. (2019). Liliun: situación actual en México. *TECSISTECATL: Revista de Economía y Sociedad de México*, 23. <https://www.eumed.net/rev/tecsistecatI/n23/lilium.html>
- García, G. J., Salas, A. E., & Azofeifa, B. J. (2015). Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento in vitro de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 3-7. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/4/2>

- Garzón, L. P. (2016). Importancia de las micorrizas arbusculares (MA) para un uso sostenible del suelo en La Amazonia Colombiana. *Luna Azul*, (42), 217-234. 10.17151/luaz.2016.42.14
- Gómez-Pedraza, D. E., Álvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2024). Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff): una especie ornamental endémica y poco valorada en México. *CIENCIA ergo-sum*, 31, 1-17. <https://doi.org/10.30878/ces.v31n0a25>
- Gómez-Pedraza, D. E., Mejía-Muñoz, J. M., Colinas, L. M. T., Juárez-Hernández, M., & Martínez-Damián, M. T. (2023). Doble sensación, nueva variedad híbrida mexicana de cosmos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 46(1), 89-91. <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.89>
- Gómez-Pedraza, D. E., Mejía-Muñoz, J. M., Martínez-Solís, J., & Morales-Vázquez, B. (2019). Morphogenetic variation in the multiplication and rooting in vitro of wild clones of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). *Acta Horticulturae*, 1237, 243-250. 10.17660/ActaHortic.2019.1237.32
- Gómez-Pedraza, D. E., Mejía-Muñoz, J. M., Morales-Vázquez, B., Peña-Ortega, M. G., & Martínez-Solís, J. (2019). Interspecific hybridization between *Cosmos atrosanguineus* Sherff and *Cosmos purpureus* (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl. *Acta Horticulturae*, 1237, 295-300. 10.17660/ActaHortic.2019.1237.38
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., Gómez-Sanabria, J. M., & Morales-García, J. L. (2019). Mutagenesis in the improvement of ornamental plants. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 25(3), 151-167. 10.5154/r.rchsh.2018.12.022
- Hind, N., & Fay, M. F. (2003). *Cosmos atrosanguineus* Compositae. *Curtis's Botanical Magazine*, 20(1), 40-48.
- Hitchon, G. M., Hall, D. A., & Szmidt R. A. K. (1990). Hydroponic production of glasshouse tomatoes in sardinian plaster-grade perlite. *Acta Horticulturae*, 287, 261-266. 10.17660/ActaHortic.1991.287.29

- Hosoki, T., Kobayakawa, H., & Ohta, K. (2003). Micropropagation of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) by repeated division of nodes/axillary shoots and adventitious shoots from microshoots. *Acta Horticulturae*, 625, 261-264. 10.17660/ActaHortic.2003.625.30
- Irsyadi, M. B. (2021). Factors That Effect of the Optimal Plantlet Growth from Tissue Culture on the Acclimatization Stage. *Proceeding International Conference on Science and Engineering*, 4, 100-104. <https://sunankalijaga.org/prosiding/index.php/icse/article/view/632/603>
- Isah, T. (2015). Adjustments to in vitro culture conditions and associated anomalies in plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 57(2), 9-28. 10.1515/abcsb-2015-0026
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. In F.A. Squeo, & L. Cardemil (Eds.), *Fisiología vegetal*, (pp. 1-28). Ediciones Universidad de La Serena.
- Kakimoto T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, 116, 233-239. 10.1007/s10265-003-0095-5
- Karyanti, Sukarnih, T., RudiYana, Y., Hanifah, N. F., Sa'adah, N., & Dasumiati (2021). Micropropagation of Red Ginger (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum) Using Several Types of Cytokinins. *Journal of Physics: Conference Series*, 1751(1), 1-10. 10.1088/1742-6596/1751/1/012051
- Kitano, S., Miyagi, A., Oono, Y., Hase, Y., Narumi, I., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., & Kawai-Yamada, M. (2015). Metabolic alterations in leaves of oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. irradiated by gamma rays. *Metabolomics*, 11, 134-142. 10.1007/s11306-014-0684-4
- Kozak, D., Parzymies, M., & Bairam, S. I. (2016). Effect of light quality on growth and development of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss shoots *in vitro*. In M. Šlosár (Ed.), *5th International Scientific Horticulture Conference* (pp. 60-64). Slovak University of Agriculture in Nitra.

- Kozak, D., Parzymies, M., & Dabski, M. (2013). The Influence of Medium solidifying agents and double-phase medium on the growth and development of *Cosmos atosanguineus* (Hook.) Voss *in vitro*. *Modern Phytomorphology*, 3, 73-75. <https://doi.org/10.5281/zenodo.161990>
- Kozak, D., Parzymies, M., Marcinek, B., & Świstowska, A. (2016). Effect of the type of explant and benzyladenine on growth and branching of *Cosmos atosanguineus* (Hook.) Voss shoots in vitro. In M. Šlosár (Ed.), *5th International Scientific Horticulture Conference* (pp. 65-70). Slovak University of Agriculture in Nitra.
- Kozak, D., Pogroszewska, E., & Szmagara, M. (2013). The influence of type and orientation of explants on in vitro growth and development of *Cosmos atosanguineus* (Hook.) Voss. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 12(1), 41-53. <https://czasopisma.up.lublin.pl/asphc/article/view/2837/1978>
- López, M. E., Gil, R. A. E., & López, Z. A. (2016). Enraizamiento de esquejes de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) “estevia”, aplicando dosis creciente de ácido indolbutírico. *ARNALDOA*, 23(2), 569-576. <https://doi.org/10.22497/672>
- Madriz-Martínez, M., Fernández-Acuña, A., Hernandez-Villalobos, S., Orozco-Rodríguez, R., & Argüello-Delgado, J. (2022). Radiosensitivity of rice (*Oryza sativa* L. var CR5272) to gamma irradiation in Costa Rica. *Cultivos Tropicales*, 43(1), Article e08.
- Medina, M. A., Medina, C. L., & Medina, L. K. (2015). Propagación in vitro de *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 5(1), 47-53.
- Mixquititla-Casbis, G., Villegas-Torres, Ó. G., Andrade-Rodríguez, M., & Sotelo-Nava, H. (2022). Propiedades físicas y químicas de sustratos en función de su granulometría y componente orgánico-mineral. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 8, Artículo e0081007. <https://doi.org/10.30973/aap/2022.8.0081007>

- Montes, C. S., Lalama-Aguirre, J. M., Echeverría-Félix, J. M., & Salazar-Torres, S. M. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dominio de las Ciencias*, 2(2), 63-89. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5761558>
- Morales-Vázquez, B., Colinas-León, M. T., Mejía-Muñoz, J. M., Juárez-Hernández, M. J., Martínez-Damián, M. T., & Martínez-Solís, J. (2024). Dulce Amanecer, primera variedad mexicana de cosmos chocolate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 47(2), 217-219. <https://doi.org/10.35196/rfm.2024.2.217>
- Morales-Vázquez, B., Colinas-León, M. T., Mejía-Muñoz, J. M., Martínez, J., Martínez-Damián, M. T., Gómez-Pedraza, D. E., & Juárez-Hernández, M. J. (2022). Conservation, micropropagation and morphological characterization of a wild population of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). *Acta Horticulturae*, 1368, 299-304. [10.17660/ActaHortic.2023.1368.38](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1368.38)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- Oku, T., Takahashi, H., Yagi, F., Nakamura, I., & Mii, M. (2008). Hybridisation between chocolate cosmos and yellow cosmos confirmed by phylogenetic analysis using plastid subtype identity (PSID) sequences. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 323-327. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512386>
- Pierik, R.L.M. (1994). Biotecnología Vegetal como herramienta en la horticultura ornamental: *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 1(1), 45-57.
- Poulter, R. T. M., & Butler, M. (2018). The selection of a seed-bearing variety of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Acta Horticulturae*, 1263, 73-76. [10.17660/ActaHortic.2019.1263.8](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1263.8)

- Ramírez, G. M. M., Peñaranda, R. A. M., Pérez, M. U. A., & Serralde, D. P. (2018). Biofertilización con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en especies forestales en vivero. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(2), 15-25. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v16n2.96>
- Ramírez, J. J., & Avitia-Rodríguez, J. A., (2018). Corredor florícola del Estado de México: la percepción de la población del cambio climático. En Pérez, C. E., & Mota, F. V. (Eds.), *Desarrollo Regional Sustentable y Turismo* (pp.272-292). Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional A.C. <https://ru.iiec.unam.mx/3785/>
- Ramírez, J. J., & Avitia-Rodríguez, J. A. (2017). Floricultura Mexicana en el Siglo XXI: Su Desempeño en los Mercados Internacionales. *Revista de Economía*, 34(88), 99-122. <https://doi.org/10.33937/reveco.2017.83>
- Resende, C. F. D., Bianchetti, R. E., Oliveira, A. M. S. D., Braga, V. F., & Peixoto, P. H. P. (2015). *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Revista Ciência Agronômica*, 46(3), 582-589. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150041>
- Rice, G. (2017). The story of *Cosmos atrosanguineus*. *Plantsman*, 16(2), 112-119. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173178326>
- Rivillas, C. A., Calle, C. M., & Ángel, C. A. (2019). Micorrizas Arbusculares. En Centro Nacional de Investigaciones de Café (Ed.), *Aplicación de ciencia, tecnología e innovación en el cultivo del café ajustado a las condiciones particulares del Huila* (pp. 52–79). Cenicafé. https://doi.org/10.38141/10791/0005_3
- Rodríguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. En Carvajal, S. (Ed.), *2006-Avances en la Investigación Científica en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias* (pp. 610-619). Universidad de Guadalajara.

- Rojas, V. P., Aguirre, P., Durán, O., & Nario, A. (2018). Aplicaciones de tecnologías nucleares en conservación y mejoramiento genético forestal bajo un escenario de cambio climático. *Ciencia e Investigación Forestal*, 24(3), 116-127.
- Rubio-Ochoa, E., de la Cruz Torres, E., Portugal, V. O., Sánchez, R. E. P., Leyva, J. F. G., & Saucedo, P. A. G. (2024). Mutagénesis por radiación gamma para mejora genética de plantas de importancia alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(5), 1-10. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i5.3747>
- Sánchez, S. H. (2022). Cultivo de tejidos vegetales para propagar y conservar especies mexicanas amenazadas. *Herreriana*, 3(2), 28-32. <https://doi.org/10.29057/h.v3i2.8096>
- Sarsu, F., Spencer-Lopes, M. M., Sangwan, R. & Penna, S. (2021). Técnicas específicas para aumentar la eficiencia del mejoramiento por mutaciones. In MM Spencer-Lopes, BP Forster & L. Jankuloski (Eds.), *Manual de Mejoramiento por Mutaciones* (pp. 171-217). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organismo Internacional de Energía Atómica.
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2022). *Las flores están en el campo, en las miradas, en las palabras....* <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/las-flores-estan-en-el-campo-en-las-miradas-en-las-palabras>
- Simon, S., & Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.007>
- Spencer-Lopes, M. M., Jankuloski, L., Mukhtar, A. G., Matijevic, M. & Kodim, A. (2021). Mutagénesis física. In MM Spencer-Lopes, BP Forster & L. Jankuloski (Eds.), *Manual de mejoramiento por mutaciones* (pp. 5-41). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organismo Internacional de Energía Atómica.

- Tejeda-Sartorius, O., Ríos-Barreto, Y., Trejo-Téllez, L. I., & Vaquera-Huerta, H. (2015). Caracterización de la producción y comercialización de flor de corte en Texcoco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 1105-1118. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i5.602>
- Udage, A. C. (2021). Introduction to plant mutation breeding: Different approaches and mutagenic agents. *Journal of Agricultural Sciences (Sri Lanka)*, 16(3), 466-483. [10.4038/jas.v16i03.9472](https://doi.org/10.4038/jas.v16i03.9472)
- van de Walle, J., Horemans, N., Saenen, E., Van Hees, M., Wannijn, J., Nauts, R., van Gompel, A., Vangronsveld, J., Vandenhove, H., & Cuypers, A. (2016). *Arabidopsis* plants exposed to gamma radiation in two successive generations show a different oxidative stress response. *Journal of Environmental Radioactivity*, 165, 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.10.014>
- Vargas-Amado, G., Castro-Castro, A., Harker, M., Vargas-Amado, M. E., Villaseñor, J. L., Ortiz, E., & Rodríguez, A. (2020). Western Mexico is a priority area for the conservation of Cosmos (Coreopsidaeae, Asteraceae), based on richness and track analysis. *Biodiversity and Conservation*, 29, 545-569. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01898-2>
- Vargas-Amado, G., Castro-Castro, A., Harker, M., Villaseñor, J. L., Ortiz, E., & Rodríguez, A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género Cosmos (Asteraceae: Coreopsidaeae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 536-555. [10.7550/rmb.31481](https://doi.org/10.7550/rmb.31481)
- Vega-Celedón, P., Canchignia, M. H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39. [10.13140/RG.2.1.5158.3609](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609)
- Villanueva, V. A., Avitia, J. A., & Ramírez, J. (2017). Los derechos humanos y las actividades económicas: floricultura en el sur del Estado De México. En ASEPELT (Ed.), *Annals of Applied Economics* (942-949). SOCIUS, ISEG, ASEPELT. <https://english.asepelt.org/annals/anales-de-economia-aplicada.html>

- Villegas, T. O., Domínguez, P. M., Albavera, P. M., Andrade, R. M., Sotelo, N. H., Martínez, R. M., Cortés, M. A., Castillo, C. C., & Magadan, S. M. (2017). *Sustrato como material de última generación*, (1^a ed.). OmniaScience. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.364>
- Wilkinson, T. I. M., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. F. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: A case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany*, 91(1), 65-74. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg009>
- Yamaguchi, H. (2018). Mutation breeding of ornamental plants using ion beams. *Breeding Science*, 68(1), 71-78. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17086>

3. EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y DE YEMAS AXILARES EN LA OBTENCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*)

3.1 Resumen

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) es una especie endémica de México a la que se le ha atribuido un potencial ornamental por las características de sus flores color marrón y su particular aroma a chocolate. La Universidad Autónoma Chapingo resguarda material *in vitro* con la finalidad de conservar y mejorar este cultivo ya que de manera natural las poblaciones son escasas. Por ende, en este trabajo se llevaron a cabo evaluaciones *in vitro* en dos etapas; durante la primera se evaluaron tres regiones de planta (apical, terminal-intermedia y basal) en combinación con reguladores de crecimiento (0.3 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ AIA, 1 mg L⁻¹ kin + 1 mg L⁻¹ AIA y 3 mg L⁻¹ kin) con la finalidad de obtener una mayor regeneración y brotación de yemas axilares. Los resultados de este experimento mostraron que la mejor región para generar explantes fue la terminal-intermedia con el mayor rango de 24.34 brotes por planta mientras que, para el uso de reguladores, se demostró que no se requiere la utilización de auxinas en la especie, sin embargo, si requiere del uso de citocininas ya que la mayor cantidad de brotes se obtuvo mediante la aplicación de 3 mg L⁻¹ kin dando un rango de 23.07 brotes. En la segunda etapa del cultivo *in vitro* se realizó una evaluación de diferentes citocininas como promotoras de la brotación. Para esto, se utilizaron kinetina, BA y 2-ip a la misma concentración de 3 mg L⁻¹. Con los resultados obtenidos, se observó que la concentración de 3 mg L⁻¹ de BA generó la mejor brotación con un rango notablemente mayor de 78.34 brotes por planta mientras que la mayor longitud de los mismos se obtuvo con el tratamiento con 3 mg L⁻¹ 2-ip. Las respuestas que mostraron las plantas confirmaron que si existe una influencia positiva de ambos factores en cosmos chocolate durante su etapa de micropropagación.

Palabras clave: brotes, citocininas, cultivo *in vitro*, reguladores de crecimiento, regiones.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Rosa Isela Martínez Contreras
Directora: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

EFFECT OF GROWTH REGULATORS AND AXILLARY BUDS ON THE *in vitro* OBTAINMENT AND MULTIPLICATION OF COSMOS CHOCOLATE PLANTS (*Cosmos atrosanguineus*)

3.2 Abstract

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) is an endemic species of Mexico that has been attributed ornamental potential due to the characteristics of its brown-colored flowers and its particular chocolate scent. The Universidad Autónoma Chapingo preserves *in vitro* material to conserve and improve this crop, as natural populations are scarce. Therefore, *in vitro* evaluations were carried out in this study in two stages. During the first stage, three plant regions (apical, terminal-intermediate, and basal) were evaluated in combination with growth regulators (0.3 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ IAA, 1 mg L⁻¹ kin + 1 mg L⁻¹ IAA, and 3 mg L⁻¹ kin) to achieve greater regeneration and sprouting of axillary buds. The results of this experiment showed that the best region for generating explants was the terminal-intermediate, with the highest rate of 24.34 shoots per plant. Regarding the use of regulators, it was demonstrated that auxins are not required for this species; however, cytokinins are necessary, as the highest number of shoots was obtained by applying 3 mg L⁻¹ kin, yielding a rate of 23.07 shoots. In the second stage of *in vitro* culture, an evaluation of different cytokinins as sprouting promoters was carried out. For this, kinetin, BA, and 2-ip were used at the same concentration of 3 mg L⁻¹. The results showed that the concentration of 3 mg L⁻¹ BA generated the highest sprouting rate, with a significantly greater value of 78.34 shoots per plant, while the greatest shoot length was obtained with the treatment of 3 mg L⁻¹ 2-ip. The responses observed in the plants confirmed the positive influence of both factors on cosmos chocolate during its micropropagation stage.

Keywords: shoots, cytokinins, *in vitro* culture, growth regulators, regions.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Rosa Isela Martínez Contreras
Advisor: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

3.3 Introducción

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) es una planta ornamental endémica de México amenazada en su hábitat natural. Los principales objetivos del estudio de esta especie son la reintroducción a su medio ambiente y su mejoramiento genético que permita obtener material para el mercado (Gómez-Pedraza et al., 2024). La conservación de germoplasma representa una de las principales fuentes para el mejoramiento y la obtención de variedades; el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una de las herramientas más utilizadas para este fin ya que permite la multiplicación acelerada y conservación de especies (Ardisana et al., 2016). Algunos de los trabajos realizados para la especie a través del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales han sido enfocados en el uso de reguladores de crecimiento con distintos fines.

Kozak et al. (2013) realizaron un trabajo sobre la influencia que presenta la orientación y el tipo de explante combinado con bencilaminopurina (BA) 1 mg L⁻¹ para la inducción de brotes. Además, Kozak et al. (2016) también llevaron a cabo una determinación de la influencia de diferentes colores de luz en medios de cultivo con BA 1 mg L⁻¹ para la inducción de brotes axilares. Gómez-Pedraza et al. (2019) realizaron un estudio sobre organogénesis indirecta a través de segmentos de hoja y segmentos nodales a diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la obtención de formación de callo, así como una organogénesis directa mediante segmentos nodales con dos yemas axilares y el uso de bencilaminopurina (BA) en concentraciones de 0, 0.5, 1, 2 y 3 mg L⁻¹. En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta *in vitro* de cosmos chocolate y la influencia que presenta la elección de explante y de reguladores de crecimiento en la producción de brotación múltiple.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Ubicación y obtención de material vegetal

Las plantas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del

departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Las estrategias de su cultivo se realizaron en dos etapas con el propósito de incrementar el número de plantas *in vitro*; Posteriormente, se seleccionaron plantas de aproximadamente 2 meses de edad y se tomaron segmentos de tallos de 1 cm con dos yemas axilares. Para la preparación del medio, se emplearon 4.3 g L⁻¹ de sales concentradas (Murashige & Skoog, 1962) MS con vitaminas de la marca Phytotechnology, suplementado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina 40 mg L⁻¹, L- cisteína 60 mg L⁻¹ y hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y un pH de 5.7. La esterilización del medio se llevó a cabo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 kg cm⁻² de presión. Se realizó el establecimiento de los segmentos en este medio de cultivo hasta obtener plantas completas, proceso que se llevó a cabo aproximadamente durante cuatro semanas de incubación. Las condiciones de incubación fueron de un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una luminosidad de 12.9 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 24 °C durante el día y 22 °C durante la noche.

3.5 Etapa I. Efecto de las yemas axilares y su posición en el tallo y de reguladores de crecimiento en la obtención y multiplicación de plantas *in vitro*.

Se separaron los tallos con las yemas axilares de acuerdo con su posición: apicales, terminal-intermedia y basales, observar la Figura 2. Estas tres regiones se evaluaron, para promover la obtención de nuevos brotes de acuerdo con la combinación de tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento auxinas y citocininas.

Se utilizó un medio de cultivo con las mismas características del empleado en la recuperación de material con 3.0 g L⁻¹ de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) en polvo adicionado con vitaminas de la marca Phytotechnology, se suplementó con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina 0.40 mg L⁻¹, L- cisteína 60 mg L⁻¹ y hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y un pH de 5.7. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 kg

cm⁻² de presión. Para su establecimiento, se cortaron explantes de aproximadamente 1 cm de longitud con dos yemas axilares; se emplearon tubos de ensaye con 20 mL de medio de cultivo en los que se colocaron 3 explantes. Los reguladores utilizados y los tratamientos evaluados se presentan en el Cuadro 2. Las condiciones a las que se incubaron las plantas en el laboratorio fueron con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luminosidad de 12.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24 °C durante el día y 22 °C durante la noche. Las variables respuesta evaluadas fueron longitud de planta, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas; los datos se tomaron 30 días posteriores a su establecimiento.



Figura 2. Regiones de planta evaluados; RA= Región apical, R T/I= Región terminal- intermedia, RB= Región basal

Cuadro 2. Tratamientos establecidos para la producción de brotación múltiple de cosmos chocolate.

Tratamiento	Región	Reguladores de crecimiento
1	Apical	0.0 mg L ⁻¹
2	Apical	0.3 mg L ⁻¹ kin + 0.3 mg L ⁻¹ AIA
3	Apical	1.0 mg L ⁻¹ kin + 1 mg L ⁻¹ AIA
4	Apical	3.0 mg L ⁻¹ kin
5	Terminal-Intermedio	0.0 mg L ⁻¹
6	Terminal-Intermedio	0.3 mg L ⁻¹ kin + 0.3 mg L ⁻¹ AIA
7	Terminal-Intermedio	1.0 mg L ⁻¹ kin + 1 mg L ⁻¹ AIA
8	Terminal-Intermedio	3.0 mg L ⁻¹ kin
9	Basal	0.0 mg L ⁻¹
10	Basal	0.3 mg L ⁻¹ kin + 0.3 mg L ⁻¹ AIA
11	Basal	1.0 mg L ⁻¹ kin + 1 mg L ⁻¹ AIA
12	Basal	3.0 mg L ⁻¹ kin

3.5.1 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño factorial completamente al azar con los factores región (3 niveles) y regulador de crecimiento (4 niveles) dando un total de 12 tratamientos. La unidad experimental fue cada explante colocando tres unidades por tubo de ensaye y un total de 8 repeticiones por tratamiento.

3.5.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4. Previo a los análisis se realizó una prueba de comprobación para distribución normal; la variable longitud de planta fue analizada con una distribución normal, mientras que las demás variables se analizaron de manera no paramétrica mediante el estadístico de Friedman. Las pruebas de medias se realizaron mediante LSD de Fisher ($p \leq 0.05$).

3.6 Resultados y discusión

3.6.1 Efecto de las yemas axilares y su posición en los tallos en la regeneración y brotación *in vitro* de cosmos chocolate.

De acuerdo a la posición de las yemas axilares en el tallo en la emisión de nuevos brotes *in vitro*, se presentaron resultados estadísticamente significativos en las cuatro variables. En cuanto a la variable longitud de tallos emitidos, se obtuvieron las mejores respuestas utilizando explantes de la zona apical respecto a las regiones intermedias y basales del tallo. Esta respuesta a la elongación generalmente se debe a que en las zonas apicales de la planta se encuentra una mayor concentración de compuestos auxínicos relacionados con el estímulo de la elongación celular (Borjas-Ventura et al., 2020). En el caso del número de hojas de igual manera, la región apical presenta los mejores resultados con el mayor rango de 26.43 hojas por planta.

Por otro lado, en las variables relacionadas con la generación de brotes, tanto en número como longitud, coinciden en una mejor respuesta en la región terminal-intermedia con un valor de 24.34 brotes y 24.53 cm de longitud (Cuadro 3 y 4), este resultado es similar con el reportado por Castro et al. (2023) quienes evaluaron solamente dos tipos de explante (apicales y basales) en cultivo de sequoia y obtuvieron mayor cantidad de brotes axilares en la región más lejana del ápice; se sabe que esta respuesta se encuentran directamente relacionada con la pérdida de dominancia apical que genera una mayor brotación. En el estudio de Suárez et al. (2014) donde también utilizaron tres regiones, los resultados coinciden ya que obtuvieron una formación de brotes mayor en explantes apicales e intermedios que en los basales. En cosmos chocolate al haber utilizado tres regiones, la región basal, presentó una oxidación mayor a las otras dos, pudiendo haber influido en el tamaño del explante, por lo que el comportamiento en variables como longitud y número de hojas resultó similar a lo obtenido en la región intermedia. En algunas plantas ornamentales como *Phalaenopsis* spp. (Blume) se ha identificado que la composición del medio de

cultivo influye en la oxidación de los explantes además de que las yemas de los nudos basales presentan un grado de diferenciación menor a las intermedias (Frausto et al., 2019).

Cuadro 3. Respuesta de cosmos chocolate por región para longitud de planta

REGIÓN	LONGITUD cm
1 Apical	1.88 a ^z
2 Terminal-Intermedia	1.13 b
3 Basal	0.95 b
DMS	0.36

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

Cuadro 4. Respuesta de cosmos chocolate por región mediante rangos del estadístico de Friedman

REGIÓN	NÚMERO DE BROTES	LONGITUD DE BROTES cm	NÚMERO DE HOJAS
1 Apical	14.50 c ^z	14.50 c	26.43 a
2 Terminal-Intermedia	24.34 a	24.53 a	14.00 b
3 Basal	19.31 b	19.00 b	12.25 b
DMS	3.00	2.70	4.51
Media obtenida	19.00	19.00	19.00

^z Letras diferentes en las medias son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

3.6.2 Respuesta de brotación en cosmos chocolate con diferentes reguladores de crecimiento

Al igual que en las regiones de la planta, los reguladores de crecimiento también presentaron algunas diferencias estadísticamente significativas para algunas variables. En el caso particular de la altura de la planta, se mostró un comportamiento similar para todos los tratamientos incluyendo al testigo sin reguladores de crecimiento, por lo que no existió alguna discrepancia a causa de la adición de estos al medio de cultivo (Cuadro 5).

La variable número de brotes presentó diferencias significativas; en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ kin se obtuvo la mejor respuesta con el mayor valor en un rango de 23.07 brotes respecto a los tratamientos testigo y de 1 mg L⁻¹ kin + 1 mg L⁻¹ AIA. Sin embargo, esta respuesta positiva con 3 mg. L⁻¹ kin presentó una similitud a la de 0.3 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ AIA con un rango cercano de 21.75 brotes. La kinetina ha sido ampliamente utilizada con el propósito de multiplicar material vegetal y se ha comprobado su efectividad en diferentes especies dentro de la familia Asteraceae; ejemplo de esto, es en plantas del género *Stevia* donde se reporta que su uso en concentraciones de 2 mg L⁻¹ favorece la respuesta en el número de brotes obtenidos y en donde a concentraciones superiores a los 4 mg L⁻¹ esta respuesta positiva tiende a disminuir. También se hace mención de que mediante la interacción de la Kinetina con una concentración baja de alguna auxina (2 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ AIB) se obtiene incluso una mejor respuesta que solo con kinetina (Ibrahim & Jawad, 2023). Otros trabajos con resultados coincidentes son los obtenidos por Moreira-Palacios et al. (2019) donde, la especie *Matricaria recutita* L. obtuvo la mayor producción de brotes en presencia de citocininas como la kin y el BA, sin embargo, las concentraciones óptimas son más bajas (0.5 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹); de igual manera reportan que la combinación de kin con auxinas es efectiva para brotación con resultados similares a los anteriormente mencionados.

Respecto a la longitud de brotes, los tratamientos con 0.3 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ de AIA y el de 3 mg L⁻¹ de kin también obtuvieron los mejores resultados comparado a los otros dos tratamientos, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia entre ellos. Se han reportado estudios en *Dahlia cultorum* 'Pirat' que mencionan la efectividad de la kinetina en concentraciones bajas (0.25 mg L⁻¹) para la obtención de brotes de mayor tamaño sin embargo los resultados de este estudio mostraron que con un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento se obtienen datos similares a cuando se aplica kinetina (Marcinek, et al., 2019). Particularmente en el caso de *Cosmos* si existe una diferencia marcada entre el efecto positivo de los tratamientos con 0.3 mg L⁻¹ kin + 0.3 mg L⁻¹ de AIA y con 3 mg L⁻¹ de kin comparados con la longitud del tratamiento testigo. Vuguziga et al.

(2020) reportan para *Bidens pilosa* L. la mejor longitud de brotes con la adición de IAA en concentraciones de 1 mg L⁻¹ sin embargo en este caso, la mejor respuesta a este regulador es con una concentración menor de 0.3 mg L⁻¹ en interacción con kin.

Para la variable número de hojas el comportamiento fue el mismo que los anteriores (Cuadro 6); los tratamientos con 3 mg L⁻¹ kin y con 0.3 mg L⁻¹ Kin + 0.3 mg L⁻¹ AIA presentaron el mayor número de hojas con rangos de 23.64 y 20.35 hojas respectivamente, sin embargo, este último, también tuvo comportamiento similar a los tratamientos de 0 mg L⁻¹ y de 1 mg L⁻¹ kin + 1 mg L⁻¹ AIA. Este comportamiento se mostró igualmente en las variables anteriores por lo que el tratamiento con 3 mg L⁻¹ kin es el que destacó al obtener los mejores resultados. Una concentración similar ha reportado Murtadha & Oladejo (2024) en su estudio de espinaca de Okinawa ya que en concentración de 2.5 mg L⁻¹ de kin tanto la longitud de planta como el número de hojas generan los valores más altos y en medida que las concentraciones de regulador disminuyen, la longitud y el número de hojas es menor; esto indica la importancia de la adición de reguladores para la obtención de plantas más vigorosas.

Cuadro 5. Respuesta de cosmos chocolate a los reguladores para longitud de planta

REGULADORES	LONGITUD cm
0 mg. L ⁻¹	1.36 a ^z
0.3 mg. L ⁻¹ kin + 0.3 mg. L ⁻¹ AIA	1.33 a
1 mg. L ⁻¹ kin + 1 mg. L ⁻¹ AIA	1.35 a
3 mg. L ⁻¹ kin	1.72 a
DMS	0.41

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman (p≤0.05).

DMS: Diferencia Mínima Significativa

Cuadro 6. Respuesta de cosmos chocolate a los reguladores mediante rangos del estadístico de Friedman

REGULADORES	NÚMERO DE BROTES	LONGITUD DE BROTES cm	NÚMERO DE HOJAS
0 mg. L ⁻¹	14.50 c ^z	14.50 c	15.62 b
0.3 mg. L ⁻¹ kin + 0.3 mg. L ⁻¹ AIA	21.75 ab	22.90 a	20.35 ab
1 mg. L ⁻¹ kin + 1 mg. L ⁻¹ AIA	18.75 b	18.43 b	18.31 b
3 mg. L ⁻¹ kin	23.07 a	21.78 a	23.64 a
DMS	3.39	3.05	5.10
Media obtenida	19.00	19.00	19.00

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman ($p \leq 0.05$).

DMS: Diferencia Mínima Significativa

De acuerdo con los resultados anteriores, en la interacción entre ambos factores se destaca que en los tratamientos 4, 6 y 8 se obtuvieron las mayores medias de los 12 tratamientos. El tratamiento 4 (región apical y 3 mg L⁻¹ kin) mostró la mayor efectividad en la búsqueda de plantas de mayor tamaño, así como en la cantidad de hojas generadas. Sin embargo, con un enfoque prioritario en la brotación, el tratamiento 8 (región terminal-intermedio y 3 mg L⁻¹ kin) generó la mayor cantidad de brotes mientras que el tratamiento 6 (región terminal-intermedio y 0.3 mg. L⁻¹ kin + 0.3 mg. L⁻¹ AIA) y 8 (región terminal-intermedio y 3 mg L⁻¹ kin) presentaron resultados muy similares con los brotes de mayor longitud. Estos resultados contemplan el tratamiento 8 como el óptimo en la generación de una mayor brotación de yemas axilares en el cultivo de cosmos chocolate.

3.7 Etapa II. Brotación múltiple de cosmos chocolate mediante el uso de citocininas

Para la etapa II, se realizó un experimento en el cual se retomó el uso del tratamiento 8 derivado de la etapa I (región terminal-intermedio y 3 mg L⁻¹ kin) para observar la respuesta de brotación múltiple de cosmos chocolate mediante el uso de ésta y otras citocininas. En todos los tratamientos se emplearon las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento. Se utilizaron explantes de aproximadamente 1 cm de longitud con dos yemas axilares y se colocaron 2 por cada tubo de ensaye con 20 mL de medio de cultivo; para este medio se

utilizaron 4.3 g L⁻¹ de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas y se modificó con la adición de L- cisteína 60 mg L⁻¹ y hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y un pH de 5.7. La esterilización del medio se llevó a cabo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 kg cm⁻² de presión. Las citocininas evaluadas a la misma concentración fueron: 1.- testigo 0 mg L⁻¹, 2.- kinetina 3 mg L⁻¹, 3.- BA 3 mg L⁻¹ y 4.- 2-ip 3 mg L⁻¹. Las condiciones a las que se incubaron las plantas en el laboratorio fueron con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luminosidad de 12.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24 °C durante el día y 22 °C durante la noche. Las variables respuesta evaluadas fueron: altura de planta, número de brotes, longitud de brotes, número de hojas y el porcentaje tanto de raíz como de callo en base al total de plantas de cada tratamiento. La toma de datos se realizó a los 45 días.

3.7.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con un total de 4 tratamientos. La unidad experimental fue cada explante colocando dos unidades por tubo de ensaye y un total de 10 repeticiones por tratamiento.

3.7.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4. El análisis se realizó mediante rangos del estadístico de Friedman ($p \leq 0.05$) y se obtuvieron porcentajes de la aparición de raíz y callo.

3.8 Resultados y discusión

3.8.1 Brotación múltiple de cosmos chocolate

Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las variables principales relacionadas con la brotación. Para el crecimiento general de las plantas se presentó una respuesta similar entre los tratamientos 1, 2 y 4 por lo

que se demostró que no existe la necesidad de suplementar los medios si lo que se busca es solamente el crecimiento de plantas sin ningún otro objetivo (Cuadro 7).

En cuanto a las variables referentes a la producción de brotes múltiples, existió una notable diferencia entre los tratamientos evaluados. En este caso con el uso de 3 mg L⁻¹ kin se presentó la respuesta menos favorable ya que se obtuvo la medida más baja de 22.75 brotes (Figura 3-b), quedando por debajo de los tratamientos testigo y de 3 mg L⁻¹ 2-ip con valores similares de 51.25 y 41.64 brotes respectivamente (Figura 3-a y d). Los mejores efectos se vieron reflejados con el uso de 3 mg L⁻¹ BA con un rango total de 78.34 brotes siendo más del triple de los obtenidos con el tratamiento más bajo de 3 mg L⁻¹ kin (Figura 3-c). Previamente se han reportado algunos trabajos para la misma especie y el uso de los mismos reguladores, en los cuales, se han obtenido resultados similares. Kozak et al. (2016) han reportado que a mayores concentraciones de BA (de 1 mg L⁻¹ y hasta 5 mg L⁻¹) el número de brotes aumenta considerablemente. También se ha reportado que la brotación depende tanto de la presencia de BA (1 mg L⁻¹) como de los colores de luz a los que se expone el cultivo (Kozak et al., 2016).

En la longitud que desarrollaron estos brotes, igualmente se encontraron diferencias, sin embargo, éstas difieren de tratamiento con respecto a los anteriores. La mayor longitud se observó en el tratamiento 4 con un rango de 70.14 cm, seguido por los tratamientos 1 y 2 que nuevamente coincidieron con resultados similares de 45.60 y 55.43 cm respectivamente. Contrario a lo que se presentó en el número de brotes, en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ BA se obtuvieron los brotes más pequeños y de entrenudos más cortos con valor de 22.81 cm. Particularmente en este tratamiento fue notoria la manera en la que a medida que el número de brotes aumentó, el tamaño de los mismos disminuyó. Esta respuesta al 2-ip para la mayor elongación coincide con el efecto en *Cotula bipinnata* Thunb; donde en concentraciones bajas también se reportan los brotes más altos (Sacco et al., 2015).

En el número de hojas, existe una diferencia significativa entre los tratamientos con reguladores de crecimiento respecto al testigo, sin embargo, los tres reguladores tuvieron un efecto similar por lo que no destacó el uso de alguno de estos para obtener mejores resultados. Existen estudios en crisantemo que han evidenciado que con la BA se presenta la mayor brotación (Imtiaz et al., 2019), sin embargo, en ciertos casos a diferencia de estos resultados, también puede generar los brotes de mayor tamaño y una mayor cantidad de hojas (Kadhim, et al., 2023).

A pesar de que se obtuvieron los brotes de mayor tamaño con el tratamiento 4, algunas de las plantas presentaron una reacción negativa con una necrosis en las hojas apicales (Figura 3-e); respecto a esto, la concentración pudo ser un factor que influyó de manera negativa, ya que se ha reportado que es una reacción que se da en presencia de diferentes reguladores de crecimiento y puede estar relacionado con algunos factores como la reacción metabólica en la planta, el exceso de humedad o el requerimiento de una mayor cantidad de oxígeno (Dévora-Rodríguez et al., 2021).

Únicamente en los tratamientos 3 y 4 se obtuvo la formación inicial de callo en la base de los explantes con porcentajes del 100% y 40% respectivamente (Cuadro 8). Gómez-Pedraza et al. (2019) mencionan que las concentraciones de 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹ de BA han dado los mejores resultados de brotación ya que coinciden en que a menor concentración la producción disminuye, sin embargo, también hablan sobre la efectividad de este regulador en la formación de callo. El uso de estas citocininas ha sido ampliamente evaluado dentro del grupo de las compuestas ya que existen especies que presentan respuestas similares a la de cosmos chocolate; una de ellas es *Bidens odorata* que también ha mostrado una respuesta similar a los reguladores BA y 2-ip al generar la mayor cantidad de brotes. Sin embargo, por el contrario, se menciona que el 2-ip es el regulador idóneo debido a que de la misma manera que cosmos chocolate, el BA ha llegado a producir tejido calloso (Torres-García et al., 2018). Existen estudios en los que la combinación de auxinas y citocininas promueven la generación de callo, sin embargo, en este caso no es necesaria la adición de una auxina ya que se

presenta un comportamiento similar al reportado por Bohórquez-Quintero et al. (2016) quienes refieren que los tratamientos que producen la mayor cantidad de brotes también tienden a desarrollar la mayor formación de callo basal como en este caso.

Los tratamientos 1, 2 y 4 generaron plantas y hojas de una tonalidad verde oscuro a diferencia del tratamiento 3 en el que se obtuvo una coloración de tono verde claro (Figura 3-f). En este caso el uso de citocininas no influyó en la generación de raíces.

Cuadro 7. Respuesta de cosmos chocolate a citocininas mediante rangos del estadístico de Friedman

TRATAMIENTO	LONGITUD cm	NÚMERO DE BROTES	LONGITUD DE BROTE cm	NÚMERO DE HOJAS
1 testigo	57.33 a ^z	51.25 b	45.60 b	33.75 b
2 kinetina 3 mg L ⁻¹	47.81 a	22.75 c	55.43 b	57.47 a
3 BA 3 mg L ⁻¹	28.93 b	78.35 a	22.81 c	55.70 a
4 2-ip 3 mg L ⁻¹	59.91 a	41.64 b	70.14 a	47.06 a
DMS	12.91	9.64	12.08	13.25
Media obtenida	48.50	48.50	48.50	48.50

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman (p≤0.05).

DMS: Diferencia Mínima Significativa

Cuadro 8. Porcentajes de raíz y callo en cosmos chocolate

TRATAMIENTO	RAIZ (%)	CALLO (%)
1 testigo	0	0
2 kinetina 3 mg L ⁻¹	0	0
3 BA 3 mg L ⁻¹	0	100
4 2-ip 3 mg L ⁻¹	0	40

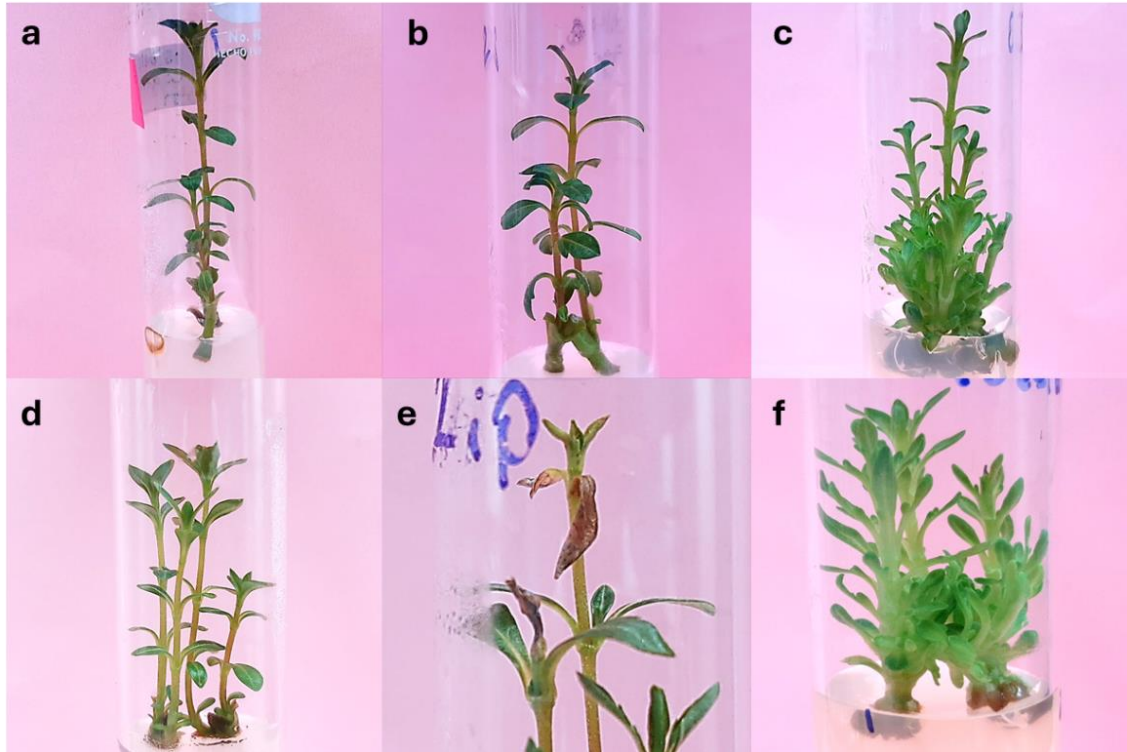


Figura 3. Respuesta de cosmos chocolate a los 45 días de cultivo. a- testigo; b- kinetina 3 mg L⁻¹; c- BA 3 mg L⁻¹; d- 2-ip 3 mg L⁻¹; e- necrosamiento de hojas apicales en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de 2-ip; f- plantas verde claro e iniciación de tejido calloso en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de BA.

3.9 Conclusiones

La región de la planta en la cual se presentó la mejor activación de brotes fue la terminal-intermedia, cosmos chocolate no requiere de auxinas ya que con el uso de 3 mg L⁻¹ de kin se generó la mayor brotación.

En la evaluación de citocininas, la concentración de 3 mg L⁻¹ de BA indujo la mayor cantidad de brotes, pero también promovió la aparición de tejido calloso en todas las plantas. La mayor longitud de brotes se obtuvo con la concentración de 3 mg L⁻¹ de 2-ip aunque llegó a generar necrosamiento foliar.

3.10 Recomendaciones

Para los brotes obtenidos con la concentración de 3 mg L⁻¹ de BA con tonalidades más claras, se sugiere que posterior a su obtención y siguiente disección de nudos, estos sean colocados en medio de cultivo libre de reguladores para un crecimiento totalmente normal de las nuevas plantas.

3.11 Literatura citada

- Ardisana, E. H., Pérez, A. S., Moreira, M. R. & Millet, G. B. (2016). Perspectivas futuras e impacto social de las biotecnologías vegetales. *ALTERNATIVAS*, 17(2), 44-51. <http://dx.doi.org/10.23878/alternativas.v17i2.116>
- Bohórquez-Quintero, M. A., Araque-Barrera, E. J., & Pacheco-Maldonado, J. C. (2016). Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas*, 38(104), 23-36. 10.17533/udea.acbi.v38n104a03
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150-164.
- Castro, G., S. L., Villegas, M. A., & Cruz, L. I. J. (2023). Concentración de kinetina y tipo de explante en la multiplicación *in vitro* de *Sequoia sempervirens* (D. Don). Endl. *Polibotánica*, (55), 81-94. 10.18387/polibotanica.55.6
- Dévora-Rodríguez, D. G., Pulido-Díaz, C., Chávez-Simental, J. A., Ortiz-Sánchez, I. A., Loera-Gallegos, H. M., & Prieto-Ruíz, J. Á. (2021). Reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetativo de vitroplantas de *Agave durangensis* Gentry. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(1), Artículo e2720. <https://doi.org/10.19136/era.a8n1.2720>
- Frausto, J. K. A., Ojeda, Z., M. D. C., Alvarado, G. O. G., García, Z. E. A., Rodríguez, F. H., & Rodríguez, P. G. (2019). Inducción de brotes a partir de varas florales de la

- orquídea *Phalaenopsis* spp. (Blume) *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1207-1218. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.608>
- Gómez-Pedraza, D. E., Álvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2024). Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff): una especie ornamental endémica y poco valorada en México. *CIENCIA ergo-sum*, 31, 1-17. <https://doi.org/10.30878/ces.v31n0a25>
- Gómez-Pedraza, D. E., Mejía-Muñoz, J. M., Martínez-Solís, J., & Morales-Vázquez, B. (2019). Morphogenetic variation in the multiplication and rooting in vitro of wild clones of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). *Acta Horticulturae*, 1237, 243-250. 10.17660/ActaHortic.2019.1237.32
- Ibrahim, A. T., & Jawad, H. A. (2023). Effect of the interaction of kinetin with indole butyric acid on the multiplication of *Stevia* plant (Spanty) *in vitro*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1262, 1-10. 10.1088/1755-1315/1262/4/042043
- Imtiaz, M., Khattak, A. M., Khan, M. A., Jalal, F., Hussain, S., Said, F., & Bo, H. (2019). Rapid *in-vitro* propagation of *chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants. *Pakistan Journal Botany*, 51(3), 1093-1098. 10.30848/PJB2019-3(11)
- Kadhim, Z. K., Sarab, A. A., Abd, F. S., AL-safaar, A. H., & Jawad, R. A. (2023). The effect of growth regulators on micropropagation of medicinal plant *Chrysanthemum hortorum* hort by using plant tissue culture technology. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*, 10(1), 92-100. <https://doi.org/10.59658/jkas.v10i2.1192>
- Kozak, D., Parzymies, M., & Bairam, S. I. (2016). Effect of light quality on growth and development of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss shoots in vitro. In M. Šlosár (Ed.), *5th International Scientific Horticulture Conference* (pp. 60-64). Slovak University of Agriculture in Nitra.
- Kozak, D., Parzymies, M., Marcinek, B., & Świsłowska, A. (2016). Effect of the type of explant and benzyladenine on growth and branching of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss shoots in vitro. In M. Šlosár (Ed.), *5th International Scientific Horticulture Conference* (pp. 65-70). Slovak University of Agriculture in Nitra.

- Kozak, D., Pogroszewska, E., & Szmagara, M. (2013). The influence of type and orientation of explants on in vitro growth and development of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 12(1), 41-53. <https://czasopisma.up.lublin.pl/asphc/article/view/2837/1978>
- Marcinek, B., Parzymies, M., Poniewozik, M., Kozak, D., & Durlak, W. (2019). The influence of growth regulators on *dahlia* propagation in tissue culture and acclimatization of plants in ex vitro conditions. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18(5), 49-61. 10.24326/asphc.2019.5.5
- Moreira-Palacios, M. O., Cabrera, H., Armijos, R., & Cueva-Agila, A. (2019). Germinación y multiplicación in vitro de *Matricaria recutita* L: los fenoles totales determinan su germinación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 6-11. 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.68509
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murtadha, M. A., & Oladejo, O. O. (2024). In vitro regeneration of ragleaf (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore) using kinetin. *Planta Tropika*, 12(1), 84-91. <https://doi.org/10.18196/pt.v12i1.20022>
- Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Di Silvestro, D., & Ruffoni, B. (2015). In vitro propagation of *Cotula bipinnata* Thunb. and *Chironia linoides* L., South African ornamental species suitable for cultivation in Mediterranean area. *Acta Horticulturae*, 1155, 625-630. 10.17660/ActaHortic.2017.1155.91
- Suárez, R., R. S., Caetano, C. M., Ramírez, H. & Morales, O. J. G. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*, 63(3), 272-281. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.40980>

- Torres-García, B. E., Morales-Domínguez, J. F., Fraire-Velázquez, S., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2018). Generación de cultivos de raíces transformadas de la planta medicinal *Bidens odorata* Cav (Compositae) y análisis fitoquímico preliminar. *Polibotánica*, (46), 241-257.
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.16>.
- Vuguziga, L., Livadariu, O., Băbeanu, N., Angelini, P., & Matei, F. (2020). Development of *in vitro* multiplication method for *Bidens pilosa* L. *AgroLife Scientific Journal*, 9(2), 377-384.
<https://agrolifejournal.usamv.ro/index.php/agrolife/article/view/715>

4. EFECTO DE AUXINAS EN EL ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*)

4.1 Resumen

El cultivo *in vitro* de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) requiere de una etapa de enraizamiento previo para la producción de plantas vigorosas y de mayor adaptabilidad antes de ser llevadas a campo. Con base en ello, se llevó a cabo una evaluación en la generación de raíces en condiciones de laboratorio. Se utilizó un medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) distribuido en 5 tratamientos con diferentes auxinas y concentraciones además de un testigo. Los tratamientos evaluados fueron 0 mg L⁻¹, AIA 0.3 mg L⁻¹, AIA 1 mg L⁻¹, AIB 0.3 mg L⁻¹ y AIB 1 mg L⁻¹. Durante esta etapa, el solidificante utilizado fue Gelrite. Los resultados indicaron que, si existió una diferencia significativa en número y longitud de raíces, principalmente entre el tratamiento testigo y el tratamiento con AIB 0.3 mg L⁻¹; sin embargo, no hubo una diferencia marcada entre todos los tratamientos con reguladores de crecimiento. La mayor emisión se presentó a los 15 días y el mayor vigor de raíz fue 2. Se registró un efecto secundario sobre estos tratamientos con la aparición de tejido calloso en un 95% del total de las plantas. El mayor diámetro de callo se presentó en la concentración de AIA 0.3 mg L⁻¹ con un diámetro de 1.10 cm. Entre las características obtenidas se encontró una textura 100% friable, un predominante color blanco del tejido y un vigor mayormente de valor 2. A medida que se presentó la formación de callo la producción de raíces fue menor y se generaron plantas poco desarrolladas. Estos resultados indican que las concentraciones de AIA y AIB evaluadas favorecen en menor medida el desarrollo radicular, sin embargo, su uso también puede ser sugerido para vías alternativas como la callogénesis.

Palabras clave: auxinas, callo, cosmos, raíces, vigor.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Rosa Isela Martínez Contreras
Directora: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

EFFECT OF AUXINS ON *in vitro* ROOTING OF CHOCOLATE COSMOS PLANTS (*Cosmos atrosanguineus*)

4.2 Abstract

The *in vitro* cultivation of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) requires a rooting stage beforehand to produce vigorous plants with greater adaptability before being transferred to the field. Based on this, an evaluation of root generation under laboratory conditions was carried out. An MS (Murashige & Skoog, 1962) culture medium was used, distributed into five treatments with different auxins and concentrations, in addition to a control. The treatments evaluated were 0 mg L⁻¹, IAA 0.3 mg L⁻¹, IAA 1 mg L⁻¹, IBA 0.3 mg L⁻¹, and IBA 1 mg L⁻¹. During this stage, Gelrite was used as the solidifying agent. The results indicated that there was a significant difference in the number and length of roots, mainly between the control treatment and the treatment with IBA 0.3 mg L⁻¹. However, there was no marked difference among all treatments with growth regulators. The highest root emergence occurred at 15 days, and the highest root vigor was 2. A secondary effect was recorded in these treatments with the appearance of callus tissue in 95% of the total plants. The largest callus diameter was observed in the IAA 0.3 mg L⁻¹ treatment, generating a diameter of 1.10 cm. Among the obtained characteristics, a 100% friable texture, predominantly white tissue color, and a vigor value mostly of 2 were found. As callus formation increased, root production decreased, leading to poorly developed plants. These results indicate that the evaluated concentrations of IAA and IBA promote root development to a lesser extent; however, their use may also be suggested for alternative pathways such as callogenesis.

Keywords: auxins, callus, cosmos, roots, vigor.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Rosa Isela Martínez Contreras
Advisor: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

4.3 Introducción

Las raíces de cosmos chocolate presentan la característica de ser raíces tuberosas lo que le confiere la capacidad de dar lugar a nuevas plantas a través de la separación de las mismas, sin embargo, se trata de un proceso lento y poco eficaz. Se ha demostrado que esta especie responde positivamente al cultivo de tejidos vegetales por lo que es la vía más utilizada en su propagación (Gómez-Pedraza et al., 2024). La generación de raíces previa a la aclimatación es considerada una de las etapas críticas que se ve afectada tanto por factores extrínsecos como la composición del medio y el uso de auxinas, principalmente el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido naftaleno-1-acético (NAA) y factores intrínsecos como la especie o el tipo de explante que se utiliza (Jafari et al., 2022). Existen especies en las que el uso de auxinas ha permitido una estimulación en la generación tanto de raíces como de callos siendo favorable para la conservación, micropropagación y mejoramiento de algunas especies (Rodríguez et al., 2014).

Entre los estudios llevados a cabo para el enraizamiento de cosmos chocolate, Hosoki et al. (2003) utilizaron IBA en concentraciones de 0, 0.49, 0.98 y 4.9 μM para promover el enraizamiento de la especie y algunos fragmentos de hoja para la inducción de callo en un medio con ácido naftaleno-1-acético (ANA) y bencilaminopurina (BA) en diferentes concentraciones. Por otro lado, Gómez-Pedraza et al. (2019), realizaron estudios sobre la influencia que existe entre el fotoperiodo y el enraizamiento, además de llevar a cabo una evaluación de diferentes concentraciones de sacarosa al 0, 3, 6 y 9% y utilizar floroglucinol con 0, 25, 50, 75 y 100 mg L^{-1} como un factor para promover la generación de raíces. El objetivo de este trabajo fue realizar la evaluación de las auxinas AIA y AIB como promotores de enraizamiento en explantes de cosmos chocolate *in vitro*. También se consideró la evaluación de callos obtenidos como efecto secundario de los tratamientos utilizados en la generación de raíces.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Enraizamiento de cosmos chocolate mediante el uso de auxinas

Las plantas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) previamente obtenidas a través del experimento de brotación múltiple, se utilizaron para promover la generación de raíces. Para ello, se elaboró un medio de cultivo en el que se utilizaron 4.3 g L⁻¹ de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas y modificado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina 0.40 mg L⁻¹ y L- cisteína 60 mg L⁻¹. Sacarosa al 4%, 4 g L⁻¹ de Gelrite y un pH de 5.7. La esterilización del medio se realizó mediante una autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 kg cm⁻² de presión. Incorporado al medio de cultivo, se evaluaron 5 tratamientos con dos auxinas a diferentes concentraciones; 1.- testigo 0 mg L⁻¹, 2.- AIA 0.3 mg L⁻¹, 3.- AIA 1 mg L⁻¹, 4.- AIB 0.3 mg L⁻¹ y 5.- AIB 1 mg L⁻¹. Para la fuente de explantes se seleccionó la región terminal-intermedia de las plantas, se diseccionaron explantes de aproximadamente 0.5 cm de longitud con presencia de dos yemas axilares y se eliminaron todas las hojas. Se colocaron dos explantes en cada tubo de ensaye con 20 mL de medio de cultivo. Las condiciones de incubación de las plantas en el laboratorio fueron con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luminosidad de 12.9 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 24 °C durante el día y 22 °C durante la noche. Las variables respuesta evaluadas fueron número de raíces, longitud de raíces, los días de emisión y el vigor (categorizado mediante números: 0- ausencia 1- bajo, 2- medio y 3- alto). Los datos fueron tomados a los 15, 30 y 90 días.

4.4.2 Callogénesis en cosmos chocolate promovido por auxinas

El callo fue observado durante el mismo experimento en medio de cultivo con 4.3 g L⁻¹ de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas y modificado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina 0.40 mg L⁻¹ y L- cisteína 60 mg L⁻¹. Sacarosa al 4%, 4 g L⁻¹ de Gelrite, un pH de 5.7 y favorecido con la adición de las auxinas. Al observar su presencia en la base de los explantes como efecto secundario de los tratamientos para generar raíz, a los 60 días de evaluación se realizó una toma de datos sobre el tejido calloso obtenido. Las variables adicionales para este

efecto fueron presencia, diámetro, vigor (categorizado mediante números: 0- ausencia, 1- bajo, 2- medio y 3- alto), color y textura.

4.5 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con un total de 5 tratamientos. La unidad experimental fue cada explante colocando dos unidades por tubo de ensaye y un total de 8 repeticiones por tratamiento.

4.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4. Las variables número y longitud de raíz se analizaron mediante estadística no paramétrica de Friedman. El diámetro de callo mediante un ANOVA y el resto mediante estadística descriptiva en el programa Statgraphics Centurion XVI. Las pruebas de medias se realizaron con una LSD de Fisher ($p \leq 0.05$).

4.7 Resultados Y discusión

4.7.1 Enraizamiento

Los tratamientos evaluados para el enraizamiento mostraron principalmente diferencias significativas entre el uso de reguladores de crecimiento en contraste con el testigo sin reguladores. Se observó que en el tratamiento 4 con AIB 0.3 mg L^{-1} se generó la mayor cantidad y longitud de raíces. A pesar de esto, en los tratamientos 3, 4 y 5 el comportamiento es similar ya que la comparación de rangos de Friedman muestra el mayor valor en la concentración de 0.3 mg L^{-1} de AIB con un valor de 77 raíces y los resultados de los tratamientos de 1 mg L^{-1} de AIB y 1 mg L^{-1} de AIA son cercanos con 66.45 y 63.64 raíces respectivamente. Referente a esto, se ha reportado que entre las principales auxinas utilizadas para generar raíz se encuentra el AIB en diferentes concentraciones, un ejemplo de ello es en plantas de árnica donde se ha comprobado que ocurre un

comportamiento similar ya que el enraizamiento se ha logrado de manera exitosa con concentraciones similares de AIB con 0.5 mg L^{-1} (Petrova et al., 2021). Para la longitud de raíces se observó el mismo comportamiento ya que en el tratamiento 4 se obtuvieron raíces más largas seguido por los tratamientos 5 y 3 respectivamente (Cuadro 9). El AIB se ha descrito como un promotor de raíces laterales, pero esto depende de las dosis que se aplican para que exista un estímulo de enraizamiento (Báez-Pérez et al., 2015). A pesar de que las dos concentraciones de AIB generaron los mejores resultados, la mayor concentración de AIA indujo un enraizamiento semejante a los anteriores. Carranza-Álvarez et al. (2021) mencionan que la concentración que se emplea de AIA se debe tomar en base al cultivo y el tipo de morfogénesis que se desee. Para el caso de cosmos chocolate, si existe una influencia importante de la aplicación de auxinas de manera exógena ya que en el medio de cultivo libre de reguladores la presencia de raíces fue nula. De manera general la inducción, iniciación y diferenciación de raíces depende de la especie con la que se trabaja, sin embargo, es importante destacar que el uso de auxinas suele tener efectos positivos influyendo en la formación de ATP mediante la fuerza motriz del protón, la funcionalidad de proteínas y como mensajero celular (Monroy et al., 2024; Jhan & Gjedde, 2002). A pesar de que, si existió una diferencia marcada entre el medio con y sin reguladores de crecimiento, la respuesta de las plantas no fue completamente positiva. En numerosos casos, el crecimiento se vio afectado al presentar plantas pequeñas, con aparición de callo y en algunas otras solo existió crecimiento de tejido calloso, lo que provocó la muerte de los explantes. Existe un efecto negativo en este suceso, ya que al presentarse formación de callo en la región basal del cultivo directamente se vio afectada la producción de raíces; esto puede deberse al incremento en la concentración de auxinas con la aplicación de AIA o AIB por lo que al incrementar el callo la calidad de las raíces disminuye (Matos et al., 2016). Algunas de las plantas que presentaron un crecimiento lento también se tornaron de color verde claro. Gómez-Pedraza et al. (2019) realizaron un trabajo donde indican que a diferencia de lo obtenido, cosmos chocolate genera un óptimo enraizamiento mediante el uso de

floroglucinol en el medio de cultivo dando como resultado producción de raíces y crecimiento de plantas vigorosas. Cabe señalar que la consistencia del medio de cultivo en este trabajo fue muy rígida con la concentración de Gelrite elegida, lo que pudo haber influido en un menor enraizamiento. La elección de gelificantes tiene una alta influencia en etapas como el enraizamiento ya que cada agente gelificante tiene sus propias características fisicoquímicas como la fuerza del gel que permite proveer una mayor o menor disposición de agua en los medios de cultivo, lo que afecta directamente en algunas respuestas como el largo de la raíz, el contenido de clorofilas y el potencial hídrico del medio de cultivo (López-Escamilla et al., 2016). Algunos de los resultados obtenidos por tratamiento a los 15 y 30 días se muestran en la Figura 4.

Cuadro 9. Resultados de enraizamiento para cosmos chocolate mediante rangos del estadístico de Friedman.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE RAICES	LONGITUD DE RAÍZ
1.- testigo 0 mg L ⁻¹	44.25 c ^z	45.62 c
2.- AIA 0.3 mg L ⁻¹	51.14 bc	52.62 bc
3.- AIA 1 mg L ⁻¹	63.64 ab	60.89 abc
4.- AIB 0.3 mg L ⁻¹	77.00 a	78.06 a
5.- AIB 1 mg L ⁻¹	66.45 ab	65.29 ab
DMS	17.40	17.41
Media obtenida	60.50	60.50

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman (p≤0.05). DMS: Diferencia Mínima Significativa

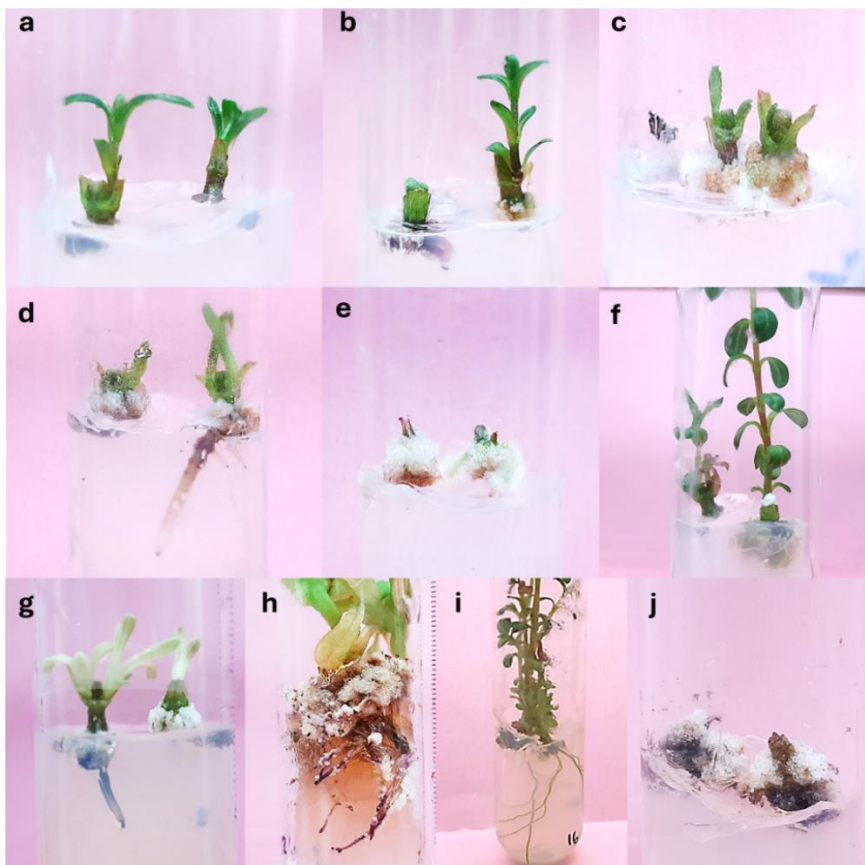


Figura 4. Respuesta de enraizamiento en cosmos chocolate. Imágenes correspondientes a la evaluación de 15 días posteriores al establecimiento: a- testigo; b- AIA 0.3 mg L⁻¹; c- AIA 1 mg L⁻¹; d- AIB 0.3 mg L⁻¹; e- AIB 1 mg L⁻¹. Evaluación 30 días posteriores: f- testigo; g- AIA 0.3 mg L⁻¹; h- AIA 1 mg L⁻¹; i- AIB 0.3 mg L⁻¹; j- AIB 1 mg L⁻¹.

En cuanto a los días de emisión, se observó que los mayores porcentajes a excepción del tratamiento 4 representan la ausencia de raíz. Los 5 tratamientos presentaron emisión de raíces a los 15 días de evaluación, principalmente el tratamiento 4 con un porcentaje de emergencia mayor a 10.83%. A los 30 días se generaron nuevas raíces solamente en los tratamientos 3, 4 y 5, siendo el 3 el que presentó un enraizamiento mayor del 5%. En la última evaluación de 90 días la formación de nuevas raíces se produjo solo en los tratamientos 2 y 3 en porcentajes iguales de 0.83%. Estos resultados indicaron que a pesar de que el 63.33% de las plantas no presentó raíz, en aquellas que si se presentaron, se tiende a seguir un comportamiento de disminución conforme pasa el tiempo ya

que el mayor porcentaje de 26.67% de emisión se dio a los 15 días (Cuadro 10, Figura 5). Además de algunos factores como el uso de auxinas, la rigidez de los gelificantes y la disposición de agua, también se ha descrito que la capacidad de enraizamiento suele estar asociada al estado de madurez de las plantas ya que en etapas juveniles hay mayor capacidad de desarrollo radicular (Lopez-Corona et al., 2019). Los resultados fueron acordes a lo antes mencionado ya que a medida que pasaron los días de evaluación y los explantes de mayor madurez, el porcentaje de emergencia de raíz comenzó a ser más bajo que al principio.

Cuadro 10. Porcentajes de emisión de raíces a través de tres fechas.

DÍAS DE EMISIÓN	T1	T2	T3	T4	T5
0 días (ausencia de emisión)	17.50%	15%	12.50%	7.50%	10.83%
15 días	2.50%	4.17%	1.67%	10.83%	7.50%
30 días	0%	0%	5%	1.67%	1.67%
90 días	0%	0.83%	0.83%	0%	0%

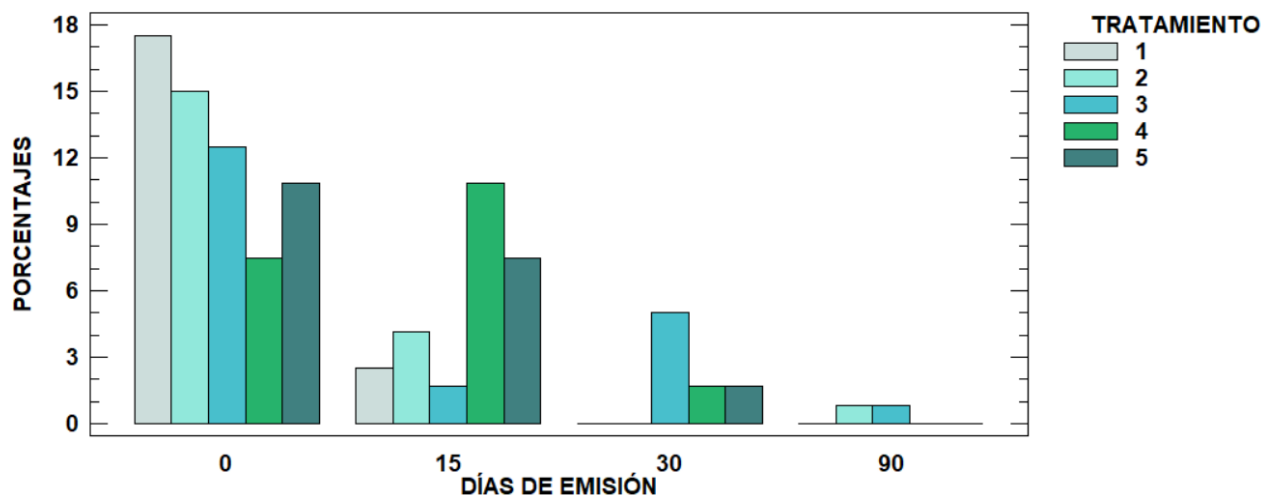


Figura 5. Emisión de raíces en cosmos chocolate; se presenta una tendencia de disminución de enraizamiento conforme pasan los días. El valor 0 indica la ausencia de raíz.

El vigor de las raíces obtenidas se determinó mediante el grosor y la presencia de raíces adventicias. El valor 0 fue aquel en el que no se presentaron raíces. Este valor obtuvo el mayor porcentaje en todos los tratamientos ya que gran parte de las plantas no generaron raíz. Entre los valores 1, 2 y 3, para el tratamiento 1 (testigo), solo se presentó un 2.50% de raíces con vigor 2. En el tratamiento 2 también se presentaron plantas con vigor 2 y 3 respectivamente; en el caso del tratamiento 3, si se registraron los tres valores y al igual que en los tratamientos anteriores, un porcentaje superior de la categoría 2. Se observó un 6.67% y 5.83% para los valores 2 y 3 respectivamente en el tratamiento 4 mientras que a diferencia de todos los anteriores el tratamiento 5 presentó el mayor porcentaje de 4.17% para vigor 1 seguido por los valores 2 y 3. En total predominó con un porcentaje del 20%, el vigor de valor 2 (Cuadro 11, Figura 6). En múltiples trabajos la evaluación del vigor suele estar vinculada a otros procesos ya que su finalidad es ofrecer información complementaria (Navarro et al., 2015).

Cuadro 11. Porcentajes obtenidos sobre el vigor de raíces en cosmos chocolate. 0 representa ausencia de raíces.

VIGOR	T1	T2	T3	T4	T5
0	17.50%	15%	12.50%	7.50%	10.83%
1	0%	0%	1.67%	0%	4.17%
2	2.50%	3.33%	4.17%	6.67%	3.33%
3	0%	1.67%	1.67%	5.83%	1.67%

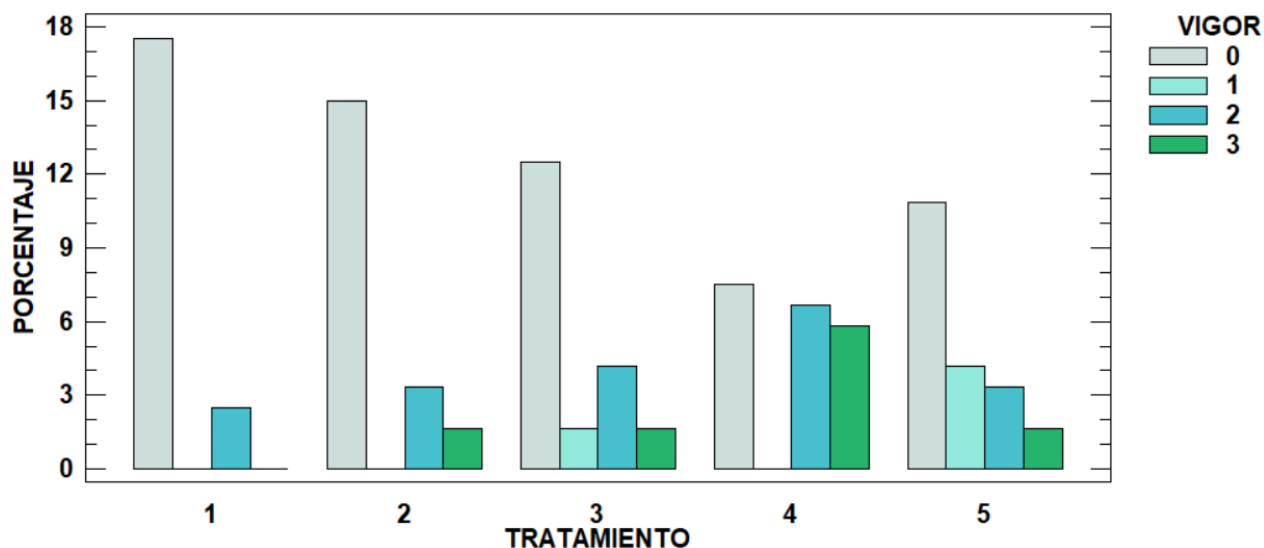


Figura 6. Vigor de raíces en plantas de cosmos chocolate. 0= ausencia de raíz; 1= bajo; 2= medio; 3= alto

4.7.2 Callo

Los tratamientos utilizados para la generación de raíces presentaron como efecto secundario la formación de callo (Figura 9). El total de tejido calloso en conjunto fue del 95% (Cuadro 12). Los tratamientos 2, 3 y 4 fueron los que mostraron formación en todas sus plantas. En el 100% de los callos obtenidos la textura fue friable. Los resultados del ANOVA refieren que si existen diferencias estadísticamente significativas en el diámetro; el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 2 con 1.10 cm de diámetro mientras que la menor medida fue del testigo con 0.53 cm de diámetro (Cuadro 13). La presencia de AIB en medios de cultivo genera la aparición de callo en diversas especies; en *Vitex mollis* Kunth se ha presentado inducción, donde la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de AIB generó callos con un ancho de 1.14 mm (Alvárez-Martínez et al., 2023). En el grupo de las asteráceas se han reportado resultados que concuerdan con esto, ya que en girasol (*Helianthus annuus* L.) el AIA tuvo un efecto positivo con una producción de callo al 100% en concentración de 0.1 mg L⁻¹ (Pola-Sánchez et al., 2019).

En este caso a pesar de que los mejores resultados se obtuvieron con la concentración más baja de AIA, existió un comportamiento similar en la

concentración más baja de 0.3 mg L⁻¹ de AIB con un diámetro de 0.92 cm, sin embargo, con este tratamiento también tiende a comportarse de manera semejante a los tratamientos 3 y 5. La eficiencia del AIA ha sido reportada por Atanacio-López et al. (2024) y refuerza estos resultados ya que concluyen que su uso generó callo friable en dos genotipos de cacao con porcentajes arriba del 74%. Lo anterior, mostró una distinción evidente entre los tratamientos 1 y 2 siendo esta última concentración la que manifestó una mayor funcionalidad para la callogénesis.

Cuadro 12. Porcentaje de callo producido en presencia de AIA Y AIB en cosmos chocolate.

	T1	T2	T3	T4	T5
Presencia	17.50%	20%	20%	20%	17.50%

Cuadro 13. Resultados de ANOVA para la variable diámetro en cosmos chocolate.

TRATAMIENTO	DIÁMETRO cm
1.- testigo 0 mg L ⁻¹	0.53 c ^z
2.- AIA 0.3 mg L ⁻¹	1.10 a
3.- AIA 1 mg L ⁻¹	0.70 bc
4.- AIB 0.3 mg L ⁻¹	0.92 ab
5.- AIB 1 mg L ⁻¹	0.73 bc
DMS	0.35

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba LSD de Fisher (p≤0.05). DMS: Diferencia Mínima Significativa

Para los callos también se realizó una evaluación sobre su vigor (Cuadro 14, Figura 7). El valor 0 indica la ausencia de formación; el tratamiento 1 presentó el mayor porcentaje de 12.50% con un vigor 2 mientras que los tratamientos 2 y 3 mostraron los porcentajes mayores del 10% con valor 3. Por otra parte, los tratamientos 4 y 5 coinciden en porcentajes iguales en 2 categorías; el tratamiento 4, presentó 7.50% tanto en callos con vigor 1 como 3 mientras el tratamiento 5 generó el mismo valor, pero en los vigores 2 y 3. De manera frecuente, estas evaluaciones se asocian con otras características evaluadas y

generalmente la información que estas proporcionan tienen correlaciones negativas y positivas con futuros aspectos como tamaño, rendimiento o masa en las plantas que se producen (Pereira et al., 2017).

Cuadro 14. Porcentajes obtenidos para la variable vigor de callo en cosmos chocolate. 0 representa la ausencia.

VIGOR	T1	T2	T3	T4	T5
0	2.50%	0%	0%	0%	2.50%
1	5%	2.50%	5%	7.50%	7.50%
2	12.50%	7.50%	5%	5%	7.50%
3	0%	10%	10%	7.50%	2.50%

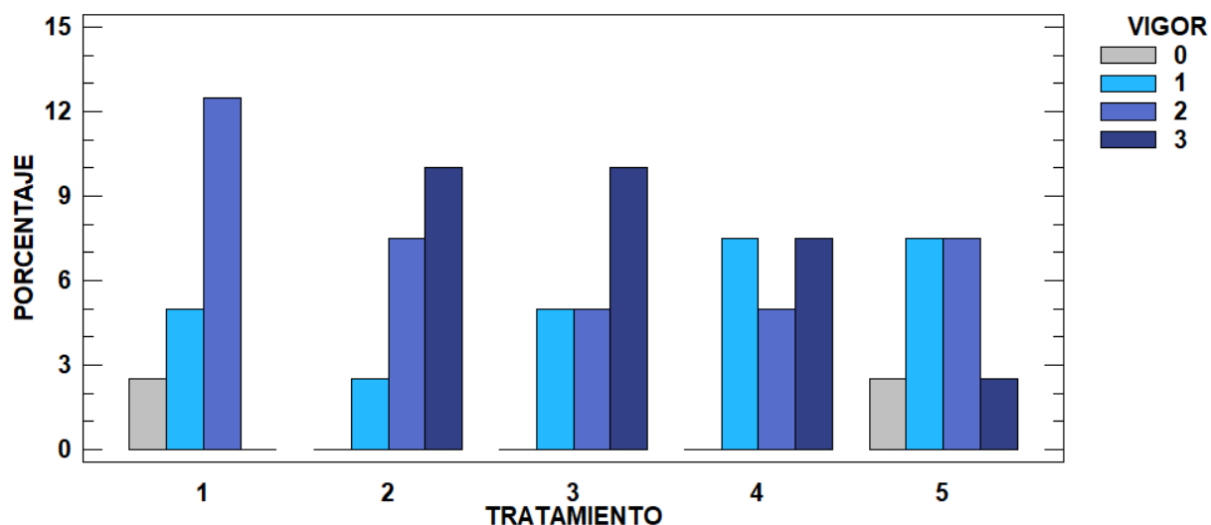


Figura 7. Vigor de callos en plantas de cosmos chocolate. 0= ausencia de raíz; 1= bajo; 2= medio; 3= alto.

Finalmente, se presentaron 3 colores de callo (Cuadro 15, Figura 8); en todos los tratamientos se encontraron callos blancos, dando un porcentaje predominante del 78.95%. En los tratamientos 1 y 2 no se observó algún otro color mientras que en el tratamiento 3 se obtuvo un porcentaje igual de color blanco y verde con el 10.53%. En el tratamiento 5 se presentó mínimamente color verde con el 5.26% y el único caso en el que se mostró tejido calloso café fue mediante el tratamiento 4 con una proporción también del 5.26%. Este porcentaje de callo blanco

obtenido fue acorde con el trabajo efectuado por López & López (2017) donde se logró un 87% de formación de callo blanquecino en el cultivo de *Jatropha macrantha*, característica considerada importante para la determinación de un callo verdadero. Por otra parte, Álvarez-Martínez et al. (2023) mencionan que la coloración del callo cambia conforme pasa el tiempo; reportan que los callos logrados en su trabajo inicialmente fueron color crema, tornándose a un verde claro para finalmente oxidarse. Estos colores coinciden con los obtenidos en este trabajo desde el color blanco hasta el café, lo que puede representar posiblemente las etapas en las que se encontraban los callos, desde las células más jóvenes hasta el inicio de la oxidación del tejido.

Cuadro 15. Porcentajes respecto a los colores de callo en cosmos chocolate

COLOR	T1	T2	T3	T4	T5
Blanco	18.42%	21.05%	10.53%	15.79%	13.16%
Café	0%	0%	0%	5.26%	0%
Verde	0%	0%	10.53%	0%	5.26%

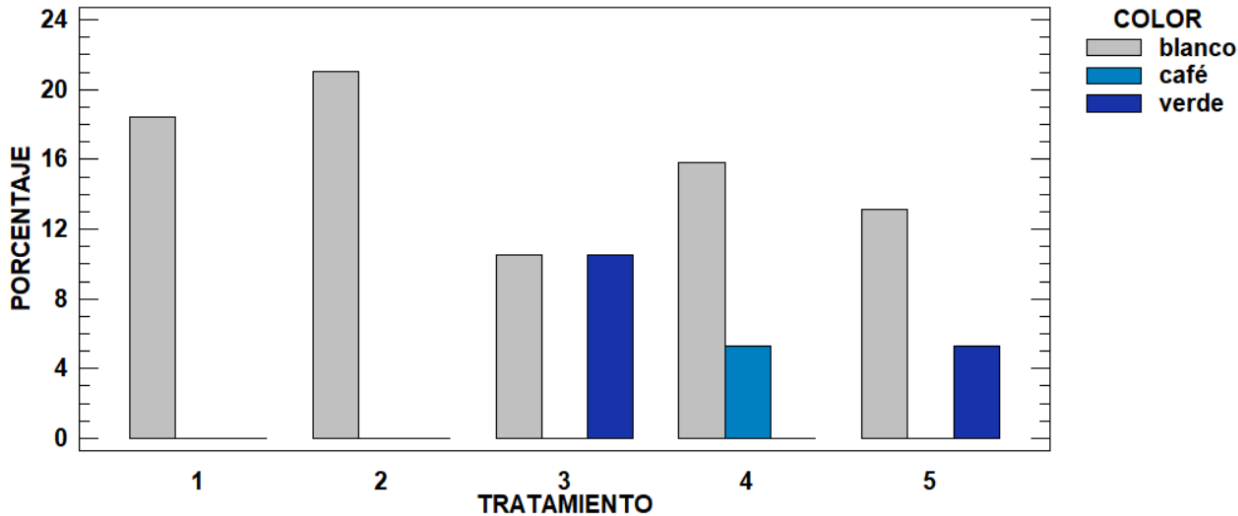


Figura 8. Porcentajes de color de callo en cosmos chocolate.

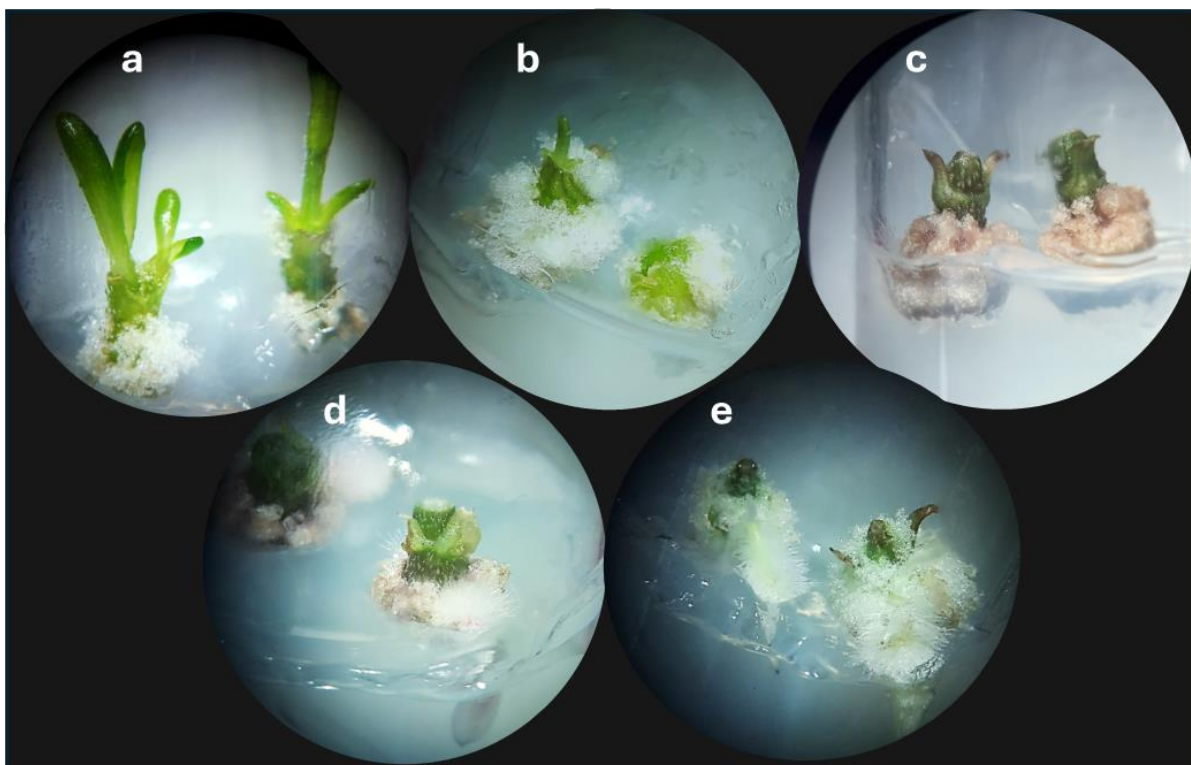


Figura 9. Producción de callo por efecto de la adición de auxinas. a- testigo 0 mg L⁻¹; b- AIA 0.3 mg L⁻¹; c- AIA 1 mg L⁻¹; d- AIB 0.3 mg L⁻¹; e- AIB 1 mg L⁻¹. Datos obtenidos a los 60 días.

4.8 Conclusión

En la concentración de 0.3 mg L⁻¹ de AIB se obtuvieron los mejores resultados en número y longitud de raíces respecto al testigo sin reguladores de crecimiento, aunque no existió una diferencia relevante con las otras concentraciones. La mayor emisión se dio en los primeros 15 días; el porcentaje de enraizamiento fue bajo y se produjeron plantas poco vigorosas.

La formación de callo se presentó en el 95% del experimento. La textura fue 100% friable, el color que predominó fue el blanco y se observó que a medida que la formación de callo aumentó, la generación de raíces disminuyó.

4.9 Literatura citada

- Álvarez-Martínez, A., Caughey-Espinoza, D. M., Ochoa-Meza, A., Buitimea-Cantúa, N. E., Fuentes-Verduzco, C., & Magaña-Barajas, E. (2023). Producción de callogénesis en explantes de *Vitex mollis* Kunth recurso fitogenético de la selva baja caducifolia. *IDESIA (Arica)*, 41(2), 77-85. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292023000200077>
- Atanacio-López, R., Sánchez-Coello, N. G., López-Escamilla, A. L., Núñez-Pastrana, R., & Luna-Rodríguez, M. (2024). Indol-3-acetic acid is an effective agent for the induction and proliferation of callus in *Theobroma cacao*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 40(1), 56-65. <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas40-6iarm50006>
- Báez-Pérez, A., González-Molina, L., Solís, M. E., Bautista-Cruz, A., & Bernal-Alarcón, M. A. (2015). Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 523-537. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000300007&script=sci_arttext
- Carranza-Álvarez, C., Trinidad-García, K. L., Reyes-Hernández, H., Castillo-Pérez, L. J., & Fortanelli-Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotechnia*, 23(1), 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v23i1.805>
- Gómez-Pedraza, D. E., Álvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2024). Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff): una especie ornamental endémica y poco valorada en México. *CIENCIA ergo-sum*, 31, 1-17. <https://doi.org/10.30878/ces.v31n0a25>
- Gómez-Pedraza, D. E., Mejía-Muñoz, J. M., Martínez-Solís, J., & Morales-Vázquez, B. (2019). Morphogenetic variation in the multiplication and rooting *in vitro* of wild clones of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). *Acta Horticulturae*, 1237, 243-250. [10.17660/ActaHortic.2019.1237.32](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1237.32)

- Hosoki, T., Kobayakawa, H., & Ohta, K. (2003). Micropropagation of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) by repeated division of nodes/axillary shoots and adventitious shoots from microshoots. *Acta Horticulturae*, 625, 261-264. 10.17660/ActaHortic.2003.625.30
- Jafari, M., Daneshvar, M. H., Jafari, S., & Hesami, M. (2022). Machine learning-assisted *in vitro* rooting optimization in *Passiflora caerulea*. *Forests*, 13(12), 1-12. <https://doi.org/10.3390/f13122020>
- Jhan T. & Gjedde P. M. (2002). H⁺-ATPases in the plasm membrane: Physiology and molecular biology. In Z. Rengel (Ed.), *Handbook of plant growth pH as the master variable* (pp. 1-22). Marcel Dekker. 10.1093/aob/mcg112
- López, Z. A., & López, M. E., (2017). Efecto sinérgico del 2,4-Diclorofenoxiacético y el Bencilaminopurina en la inducción de callos de *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae). *REBIOL*, 37(2), 22-26. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2118>
- Lopez-Corona, B. E., Mondaca-Fernandez, I., Gortares-Moroyoqui, P., Peña, J. H., Meza-Montenegro, M. M., Balderas-Cortes, J. J., Vargas-Lopez, J. M. & Rueda-Puente, E. O. (2019). Technique of cutting in agriculture: an alternative at the vanguard. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2), 505-517. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2795/1267>
- López-Escamilla, A. L., López-Herrera, M., & Loaiza-Alanís, C. (2016). Effect of different gelling agents on *in vitro* germination and seedling development of *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). *Polibotánica*, (42), 153-166. 10.18387/polibotanica.42.8
- Matos, R. A., Capote, B. I., Pérez, M. A., Lezcano, M. Y., Aragón, A. C. E., Pina, M. D., Vives, H. K., Daquinta, G. M., & Escalona, M. M. (2016). Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales*, 37, 49-56. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.1717.7202>
- Monroy, G. I., Villegas, M. A., Peña, V. C. B., Barrientos, P. A. F., Ruiz, P. L. D. M., & Castro, G. S. L. (2024). pH, dilución y concentraciones de alcohol de AIB en el

- enraizamiento de *Ficus carica*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(4), Artículo e3224. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i4.3224>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Navarro, M., Febles, G., & Herrera, R. S. (2015). Vigor: essential element for seed quality. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4), 447-458. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/486>
- Pereira, A. S., Silva, G. O., Carvalho, A. D., & Ponijaleki, R. S. (2017). Performance of advanced potato clones: plant vigor, tuber yield and specific gravity. *Horticultura Brasileira*, 35(3), 440-444. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620170321>
- Petrova, M., Zayova, E., Geneva, M., Dimitrova, L., Vitkova, A., & Stanilova, M. (2021). Multiplication and conservation of threatened medicinal plant *Arnica montana* L. by *in vitro* techniques. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(1), 57-65.
- Pola-Sánchez, E., Cruz-Vázquez, A. O., Santiz-Gómez, J. A., López-López, S. L., Suchiapa-Díaz, R. O., & Gómez-Guirao, A. (2019). Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Ibciencias*, 2(2), 7-11. <http://www.revistas.unach.mx/index.php/ibciencias/article/view/235>
- Rodríguez, B. M. M., Latsague, V. M. I., Chacón, F. M. A., & Astorga, B. P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111-118. 10.4067/S0717-92002014000100011

5. UTILIZACIÓN DE RADIACIÓN GAMMA Y DETERMINACIÓN DE DL₅₀ EN YEMAS AXILARES DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*) EN CULTIVO *in vitro*

5.1 Resumen

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) es una planta endémica de México. A pesar de esto, las poblaciones son escasas por lo que su variabilidad genética es limitada, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas ante esta problemática. De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la exposición de yemas axilares en condiciones *in vitro* a radiación Gamma con Cobalto-60 y se realizó una evaluación de los efectos generados por diferentes dosis en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de llevar a cabo una determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) a través de la supervivencia. Las dosis utilizadas fueron 10, 20, 30, 40 Grays y un testigo sin exposición. Las evaluaciones se dividieron en dos etapas; la primera mostró una supervivencia del 100% de plantas tras la exposición, sin embargo, en el desarrollo no se registró una respuesta favorable en la longitud de planta y número de brotes ya que el crecimiento presentó un efecto retardado. Durante la segunda etapa, la aparición de nuevos brotes continuó siendo un proceso retardado en todos los tratamientos expuestos, sin embargo, se obtuvo la aparición de algunos brotes y masas celulares particulares para cada tratamiento. Se observó el efecto negativo de altas dosis con la muerte de todos los explantes irradiados con 30 y 40 Grays. La Dosis Letal Media (DL₅₀) se obtuvo en 20 Grays con una supervivencia del 52.5% demostrando que las yemas de cosmos chocolate son tolerantes a bajas dosis de radiación pudiendo dar paso a su utilización para la generación de variabilidad.

Palabras clave: cobalto-60, DL₅₀, rayos Gamma, supervivencia, yemas axilares

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Rosa Isela Martínez Contreras
Directora: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

USE OF GAMMA RADIATION AND DETERMINATION OF LD₅₀ IN AXILLARY BUDS OF CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus*) ON *in vitro* CULTURE

5.2 Abstract

Chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) is an endemic plant of Mexico. Despite this, its populations are scarce, leading to limited genetic variability, which has driven the search for alternatives to address this issue. Based on this, this study involved exposing axillary buds to *in vitro* conditions with Gamma radiation using Cobalt-60 and evaluating the effects of different doses on plant growth and development. Additionally, the study determined the Median Lethal Dose (LD₅₀) through survival analysis. The doses applied were 10, 20, 30, and 40 Grays, along with a control group with no exposure. The evaluations were divided into two stages. The first stage showed 100% plant survival after exposure; however, there was no favorable response in plant length and number of shoots, as growth exhibited a delayed effect. During the second stage, the emergence of new shoots continued to be a delayed process in all exposed treatments; however, some shoots and specific cell masses appeared in each treatment. The negative effects of high doses were observed, with the death of all explants irradiated with 30 and 40 Grays. The Median Lethal Dose (LD₅₀) was determined to be 20 Grays, with a survival rate of 52.5%, demonstrating that chocolate cosmos buds are tolerant to low radiation doses, which could be used to generate genetic variability.

Keywords: cobalt-60, LD₅₀, gamma rays, survival, axillary buds.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Rosa Isela Martínez Contreras
Advisor: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

5.3 Introducción

Cosmos atrosanguineus es una especie de carácter microendémico con rangos elevacionales estrechos que además requiere ciertas características particulares en su hábitat natural (Castro-Castro et al., 2017). Debido a que esta especie no produce semillas y posee poca variabilidad, se ha recurrido a otras alternativas para su estudio, conservación y mejoramiento; una opción, es a través de la tecnología nuclear que es considerada una herramienta de suma importancia para la creación de variabilidad genética inexistente en la naturaleza y que se obtiene mediante radiación ionizante, lo que deja a un lado la aplicación de tecnologías tradicionales como la hibridación; esta alternativa además, puede llegar a mostrar ventajas frente al cambio climático y presentar una mejor adaptabilidad de las especies (Rojas et al., 2018). En cosmos chocolate, al ser considerada una planta con potencial ornamental al igual que otras plantas que son utilizadas para jardinería o plantas de maceta, se busca incrementar algunos rasgos novedosos como el color y forma de las flores, por lo que también es utilizada la técnica de inducción de mutaciones mediante radiación gamma para este fin (Pallavi et al., 2017).

De manera más específica, se han realizado algunas investigaciones para el género *Cosmos* en las que se ha utilizado la radiación gamma con diferentes propósitos; tal es el caso de Ayudhaya et al. (2022) quienes sometieron a rayos gamma semillas de *Cosmos sulphureus* Cav. en dosis de 0, 100, 200 y 300 Gy con el fin de estudiar su efecto mediante la supervivencia y el cambio morfológico de las plantas. El uso de esta tecnología dentro del género también ha sido aplicado en la especie *Cosmos caudatus* Kunth con la finalidad de observar la modificación de características en las plantas y el cambio en el contenido de metabolitos secundarios para lo que también han sido irradiadas semillas en dosis de 50 a 300 Gy en intervalos de 50 Gy (Elizar et al., 2018). En relación con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto en yemas axilares de plantas *in vitro* de cosmos chocolate tras ser sometidas a diferentes dosis de rayos Gamma y la determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀).

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Irradiación de yemas axilares *in vitro* mediante rayos Gamma

Posterior a la obtención de plantas de cosmos chocolate mediante el protocolo de brotación múltiple anteriormente utilizado, parte de estas plantas se seleccionaron de manera aleatoria para someter a irradiación; para ello se preparó medio de cultivo básico, sin reguladores de crecimiento con 4.3 g L⁻¹ de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas y se modificó con la adición de L- cisteína 60 mg L⁻¹ y hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y un pH de 5.7. Se colocaron 20 mL de medio de cultivo en cajas Petri de plástico. En cada caja se distribuyeron 10 explantes de aproximadamente 1 cm de longitud sin hojas y con dos yemas axilares (Figura 10-a). El material vegetal fue llevado al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) ubicado en Carretera Toluca - México, La Marquesa, México, e irradiado con el irradiador LGI-01, TRANSELEKTRO. Las dosis de exposición seleccionadas fueron 10, 20, 30 y 40 Grays. Los minutos de exposición para cada dosis fue de 1.6, 3.2, 4.8 y 6.4 minutos respectivamente; también se utilizó un tratamiento testigo que no fue expuesto. Posterior a la irradiación, se realizaron dos etapas de manejo del material nuevamente en condiciones de laboratorio.

Durante la etapa I, todos los explantes se colocaron en medio de cultivo básico nuevo, con la misma composición del anterior; 4.3 g L⁻¹ de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas y se modificó con la adición de L- cisteína 60 mg L⁻¹ y hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y un pH de 5.7 para favorecer la recuperación de las plantas debido al estrés generado por la exposición y para posteriormente realizar una selección del material superviviente. Se colocaron 4 explantes en tubos de ensaye durante cinco semanas (Figura 10-b).

En la etapa II, se realizó nuevo medio de cultivo para promover la generación de brotes utilizando el medio de brotación múltiple con 4.3 g L⁻¹ de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con vitaminas, L- cisteína 60 mg L⁻¹, hemisulfato de adenina 80 mg L⁻¹ y BA 3 mg L⁻¹. Sacarosa al 3%, 8 g L⁻¹ de agar y pH de 5.7. La

esterilización de todos los medios de cultivo utilizados durante este experimento se llevó a cabo mediante una autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 kg cm⁻² de presión. En este caso, se emplearon frascos de vidrio con capacidad de 500 mL y se colocaron 75 mL de medio; cada frasco contó con 10 explantes. Las condiciones de incubación de las plantas en el laboratorio fueron iguales para cada etapa con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luminosidad de 12.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24 °C durante el día y 22 °C durante la noche.

Las variables respuesta para la etapa I fueron longitud, número de brotes y porcentaje tanto de raíz como de callo en base al total de plantas de cada tratamiento; estas variables fueron tomadas a los 35 días. En la etapa II se evaluó de manera individual cada yema axilar mediante la longitud de brotes y número de hojas, así como el porcentaje tanto de raíz como de callo en base al total de plantas de cada tratamiento.; estos datos fueron tomados a los 45 días. Tras la última fecha de evaluación se realizó la determinación de la DL₅₀ con respecto a la sobrevivencia de explantes de cada dosis.

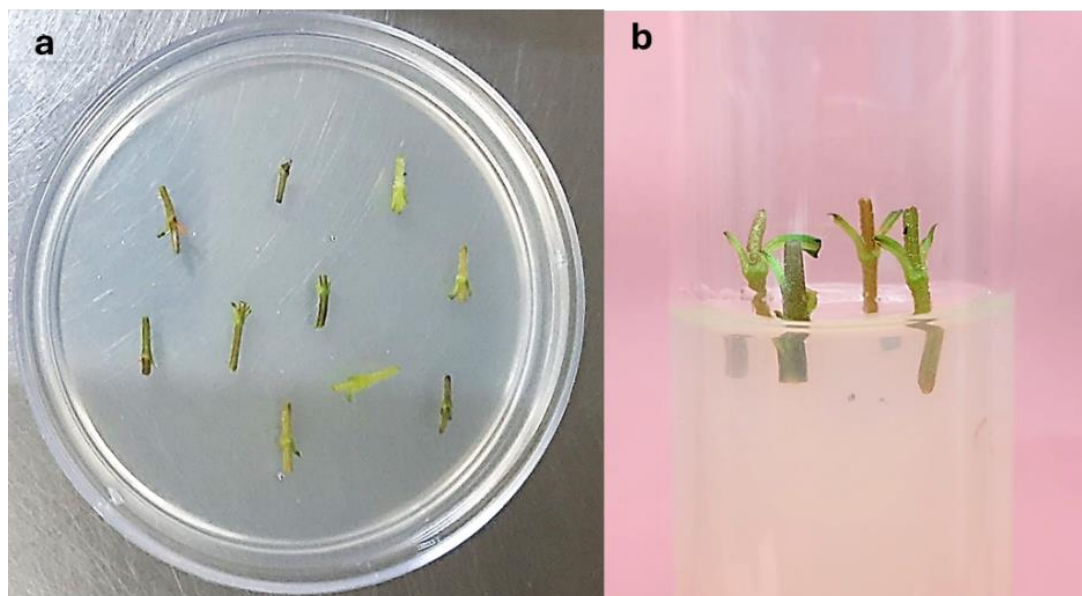


Figura 10. a- explantes irradiados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). b- resiembra de explantes tras la exposición a rayos Gamma.

5.5 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un total de cinco tratamientos. La unidad experimental consistió en explantes, colocados 10 en cada caja Petri, el total de repeticiones para cada tratamiento fue de 40 explantes y el total de yemas axilares individuales utilizadas fue de 400 repartidas en los cinco tratamientos.

5.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4. La longitud, número de brotes, longitud de brote y número de hojas se evaluaron mediante un ANOVA y las pruebas de medias se realizaron con una LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). La presencia de raíz y callo fue mediante estadística descriptiva y la DL_{50} mediante una regresión simple lineal en el programa Statgraphics Centurion XVI.

5.7 Resultados y discusión

5.7.1 Etapa I

Durante la etapa de recuperación, se obtuvo una respuesta positiva de los explantes por lo que no fue necesaria la selección de material para la siguiente fase ya que, durante las cinco semanas de evaluación, a pesar de que el crecimiento de los explantes tuvo un efecto retardado se observó una supervivencia del 100%. Se obtuvieron diferencias significativas para las variables longitud de planta y número de brotes (Cuadro 16). Para la longitud, se registraron tres grupos diferentes. La mayor longitud de plantas en este caso fue del tratamiento testigo con una media de 2.90 cm siendo estadísticamente el mejor resultado. Los tratamientos de 0, 10 y 20 Grays siguieron el mismo comportamiento, pues a medida que la dosis aumentó el rango de longitud disminuyó. Particularmente en las dosis de 30 y 40 Grays sucedió lo contrario, pues a los 40 Grays la media fue superior a la de 30 Grays con 1.04 y 0.95 cm respectivamente. Este efecto, anteriormente ha sido observado de manera

similar, pues se ha identificado que existe una disminución en el crecimiento de plantas conforme aumentan las dosis, lo que indica además, la sensibilidad de las especies a la radiación (Chandrashekar, 2014). Información similar reportada por Salomón et al. (2017) menciona que existe una fuerte reducción de la emergencia de plantas a medida que se incrementa progresivamente la dosis; además, Hernández-Muñoz et al. (2017) observaron en *Laelia autumnalis* que dosis mayores de 35 Grays provocan plantas más pequeñas.

En el número de brotes se presentó un comportamiento similar a la longitud, ya que de igual manera se generaron tres grupos diferentes significativamente. Los tratamientos testigo y 10 Grays obtuvieron los valores más altos de 1.34 cm respectivamente para la brotación mientras que el valor más bajo fue al igual que en la longitud la dosis de 30 Grays. El comportamiento de la dosis de 10 Grays para cosmos chocolate no superó la brotación del tratamiento testigo difiriendo de los resultados en *Fragaria* donde se ha observado que los mayores porcentajes de proliferación de brotes se presenta en dosis bajas de 10 Grays mientras que a mayores de 30 existe un efecto inhibitorio (Gupta et al., 2018), así como en el cultivo de *Gentiana kurro* Royle donde 10 Grays produjeron el mayor número con 6.83 brotes por explante (Alphonse et al., 2022).

El comportamiento en ambas variables refleja que si existió un efecto negativo a mayor dosis, ya que como se muestra en la Figura 11, en 30 y 40 Grays existe una tendencia similar de disminución para ambas variables, por lo que para esta especie la dosis de 30 Grays fue la que mostró los resultados más bajos de todas las exposiciones. El daño que provoca la exposición a la radiación puede traer consigo algunas deleciones de secuencia de nucleótidos de ADN que causan cambios en el marco de lectura, productos proteicos inactivos o transcripciones defectuosas que provocan división celular anormal, muerte celular, mutación, falla de tejidos y órganos o reducción del crecimiento (Olasupo et al., 2016); las dosis más altas pudieron ocasionar algunos daños severos a los tejidos que durante esta etapa no fueron notorios, sin embargo existe la posibilidad de verse reflejados en el crecimiento posterior.

Cuadro 16. Respuesta de cosmos chocolate a la irradiación Gamma durante la primera etapa

DOSIS (GRAYS)	LONGITUD CM	NÚMERO DE BROTES
0	2.90 a ^z	1.34 a
10	1.24 b	1.34 a
20	1.07 c	0.77 b
30	0.95 c	0.27 c
40	1.04 c	0.37 c
DMS	0.15	0.16

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

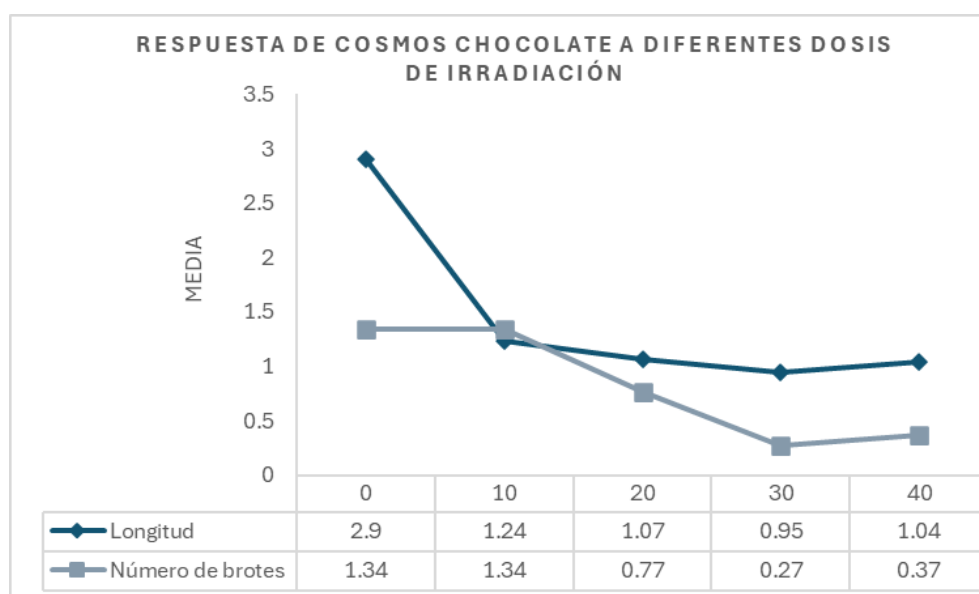


Figura 11. Tendencia de disminución a mayor dosis de irradiación en cosmos chocolate durante la etapa I.

La presencia de raíz fue casi nula, en este caso, en el único tratamiento que se mostró la generación de raíces fue el testigo con un valor por debajo del 1% (0.67%) por lo que la radiación tuvo influencia negativa en la generación de raíces; de manera similar Antúñez-Ocampo et al. (2017) refieren que la raíz es altamente sensible a la irradiación encontrando que aquellas plantas no irradiadas mostraban mejores raíces. En el caso de callo, si existió presencia en los tratamientos 1 y 2. El porcentaje más alto se presentó en el testigo (T1) con

el 12.50% mientras que con 10 Grays (T2) se produjo un 3.33% y se observó que a partir de los 20 Grays (T3) existió una inhibición en la producción de callo (Cuadro 17). Lo anterior puede estar vinculado a la afectación que existe a nivel celular ya que, Martirena-Ramírez et al. (2015) mencionan que existe una disminución en el crecimiento de callos con diferentes dosis de radiación y lo relacionan con la detención del ciclo celular en la fase G2 además de daños en todo el genoma. Sin embargo, también podría estar relacionado al efecto tardío que provoca la irradiación y la falta de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Cuadro 17. Porcentajes obtenidos de raíz y callo durante la primera etapa.

	T1	T2	T3	T4	T5
Raíz	0.67%	0%	0%	0%	0%
Callo	12.50%	3.33%	0%	0%	0%

5.7.2 Etapa II

Durante la segunda etapa de evaluación al cultivo, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las variables longitud de brote y número de hojas (Cuadro 18). La respuesta obtenida fue similar a la primera etapa ya que los mejores resultados se observaron en las plantas con dosis más bajas. Para longitud de brote, las mayores medias obtenidas se presentaron en los tratamientos testigo (T1) (Figura 13-a) y la dosis de 10 Grays (T2) con 1.52 y 1.50 cm respectivamente. En la dosis de 20 Grays (T3) se obtuvieron brotes de menor tamaño con 0.26 cm mientras que las dosis de 30 (T4) y 40 (T5) tuvieron un comportamiento similar al generar brotes aún más cortos (Cuadro 18). Abdulhafiz et al. (2018) concuerdan con la obtención de brotes de mayor tamaño en el testigo y menores en dosis altas en el cultivo de *Musa* spp. Durante esta evaluación las diferencias morfológicas de los brotes comenzaron a ser evidentes ya que, en algunas plantas sometidas a irradiación, se presentaron curvaturas (Figura 13-b), aparición de masas celulares (Figura 13-c), en algunos casos hubo un aspecto

de encapsulamiento del brote (Figura 13-e) y en la mayoría una brotación tardía (Figura 13-d). Kaur et al. (2017) encontraron un efecto de hormesis en dosis bajas mientras dosis altas provocaron anomalías y la muerte de plantas. El tratamiento de 10 Grays (T2) obtuvo menores anomalías, sin embargo, en cuanto a longitud no se presentó mejora alguna ante el testigo, lo que coincide con Gálvez-Marroquín et al. (2023) donde el testigo de *Hibiscus sabdariffa* L. obtuvo las plantas más grandes. De igual manera, Serrano-Fuentes et al. (2022) refieren que en *Vanilla planifolia* la mayor longitud de brotes se obtiene entre los 0 y 20 Grays. En el número de hojas se encontró una media mayor en el tratamiento de 10 Grays con la generación de 8.60 hojas mientras que el testigo presentó una media de 7.29 hojas; debido a las características de los brotes que se obtuvieron en los tratamientos de 20, 30 y 40 Grays, la presencia de hojas se vio afectada, lo que demostró una vez más que a medida que la dosis incrementa, algunas características presentan daños. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Díaz-Juárez et al. (2022) quienes indican que, a mayores dosis, hay mayor efecto de reducción de la expresión fenotípica de caracteres y un retraso en el crecimiento. En la Figura 12, se observa como los valores de longitud y número de hojas (a excepción de 10 Grays) mostraron un comportamiento similar y a partir de la dosis 20 (T3) se presentó una tendencia de disminución drástica de los valores, sobre todo para las dosis de 30 (T4) y 40 Grays (T5) respectivamente. En esta fase comenzaron a mostrarse zonas necrosadas en los explantes y muerte de gran parte de ellos en dosis altas. Previamente, se ha mencionado que esto se encuentra ligado a que la irradiación afecta la pared y la membrana celular y existe una disminución en el crecimiento del tejido cambiando la morfología de las células de la planta además de impedir la absorción de agua a las células (Khan et al., 2016).

En esta fase no se presentó enraizamiento en ningún tratamiento; nuevamente si existió la presencia de callo, ahora en todos los tratamientos a excepción de la dosis de 30 Grays (Cuadro 19). A pesar de encontrarse en todos los tratamientos, los porcentajes fueron bajos, se obtuvo como máximo el 8.17% en el tratamiento testigo; durante la etapa I se mostró que a medida que la dosis incrementa, el

callo presente es menor, en este caso pudo haber una influencia del medio de cultivo debido a que se agregaron citocininas, aunque a pesar de ello, los porcentajes de presencia no fueron mayores al 2%. Estos porcentajes bajos podrían ser explicados mediante las altas dosis de irradiación y su interacción con las fitohormonas ya que Khalil et al. (2015) refieren que puede existir un efecto negativo sobre los reguladores de crecimiento endógenos encargados de estimular la división celular.

Cuadro 18. Respuesta durante la segunda etapa de cosmos chocolate

DOSIS (GRAYS)	LONGITUD DE BROTE CM	NÚMERO DE HOJAS
0	1.52 a ^z	7.29 b
10	1.50 a	8.60 a
20	0.26 b	2.21 c
30	0.02 c	0.22 d
40	0.03 c	0.30 d
DMS	0.16	0.83

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba LSD de Fisher ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

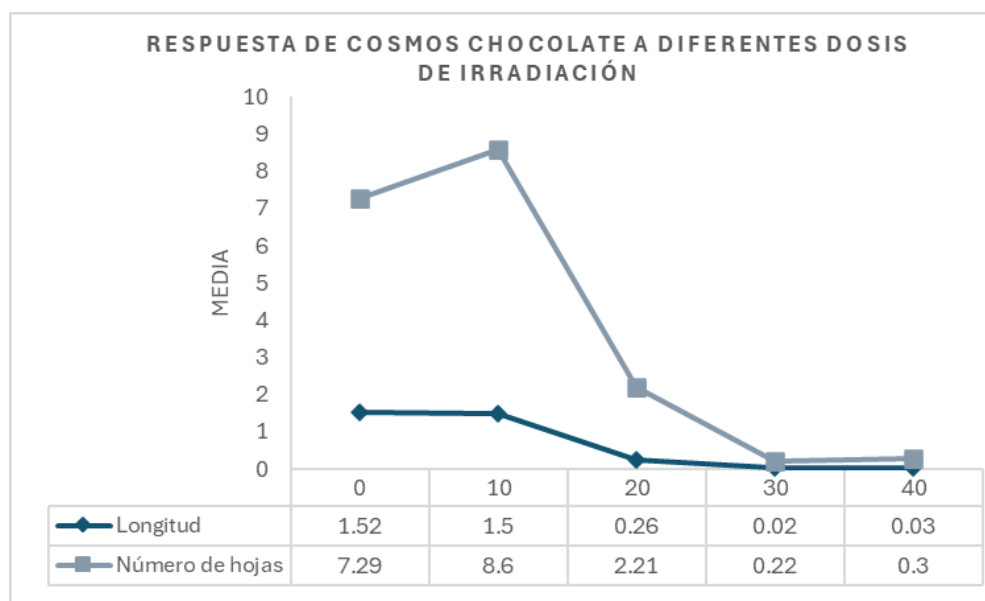


Figura 12. Tendencia de disminución a mayor dosis de irradiación en cosmos chocolate durante la etapa II.

Cuadro 19. Porcentaje de callo presente en cosmos chocolate durante la etapa II.

	T1	T2	T3	T4	T5
Presencia	8.17%	1.83%	0.33%	0%	0.33%

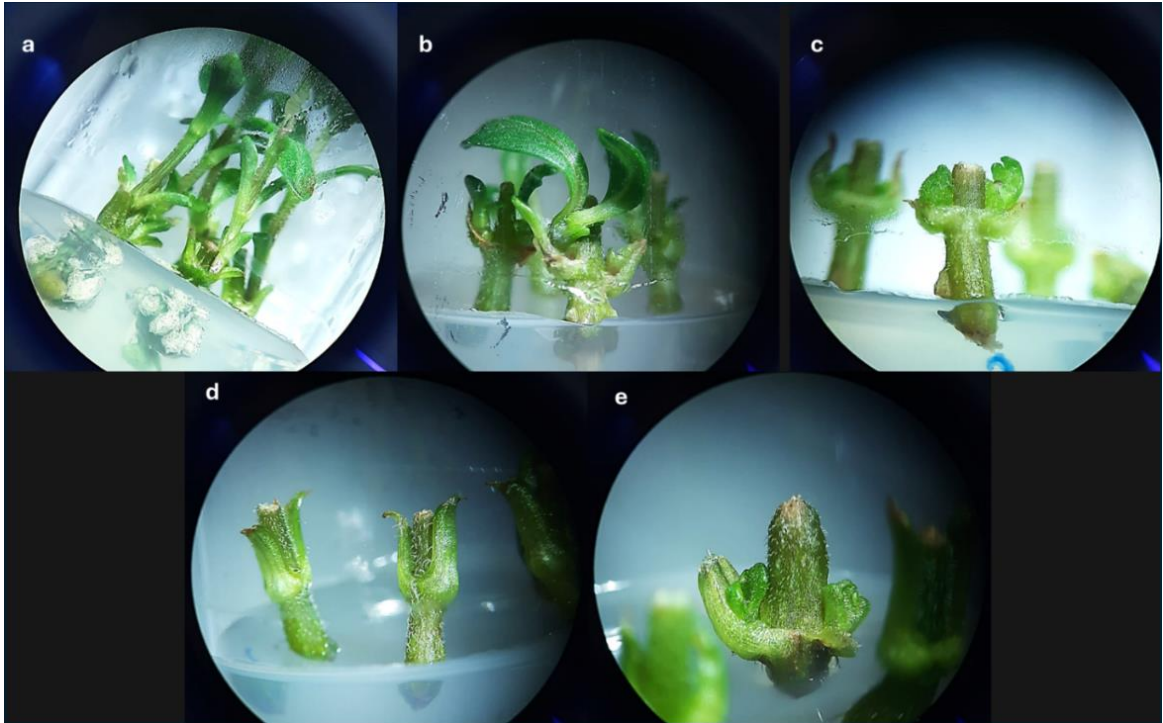


Figura 13. Crecimiento de plantas irradiadas durante la etapa II, 15 días posteriores a su cultivo. a- testigo con crecimiento normal; b- 10 Grays, brote con crecimiento curvo; c- 20 Grays, crecimiento de masa celular indiferenciada (lado izquierdo); d- 30 Grays, encapsulamiento de brotes; e- 40 Grays, crecimiento retardado de brotes.

5.7.3 Determinación de la DL_{50}

A través de la supervivencia de las plantas irradiadas y un modelo de regresión lineal simple se determinó que la DL_{50} fue aproximadamente a los 20 Grays con una supervivencia del 52.5% (Figura 14). El comportamiento que mostró cosmos chocolate fue de tendencia lineal negativa ya que la supervivencia se vio disminuida a medida que la dosis de radiación aumentó, pues finalmente las plantas de 30 (T4) y 40 Grays (T5) murieron en su totalidad. Se obtuvo una $r^2=0.94$ explicando que el 94% de la supervivencia obtenida se relaciona con la

irradiación. Bravo & Díaz-López (2021) reportan que la supervivencia en *Helianthus annuus* L. también presenta una tendencia a disminuir a medida que la irradiación aumenta coincidiendo con los resultados obtenidos para cosmos chocolate. Se ha reportado que una de las causas de la alta tasa de mortalidad de las plantas a mayores dosis está relacionada al daño celular que se ocasionó ya que tras la exposición el mecanismo de reparación de ADN no es capaz de reparar el daño, lo que lleva a la muerte celular (Rene et al., 2014). Además de este daño que se produce a nivel ADN, otra causa puede ser el tipo de material elegido, pues se debe considerar la susceptibilidad; en el caso de semillas se ha demostrado que las dosis que toleran son mayores a la de material que no cuenta con una cubierta como las yemas axilares o los callos. Desde esta perspectiva se reporta que en callos existe un comportamiento similar con respecto a la DL_{50} pues en *Phaseolus vulgaris* L. se encuentra alrededor de los 30 Grays acercándose a lo obtenido en este trabajo (Martirena-Ramírez et al., 2018). Para la irradiación de yemas axilares en algunas otras especies se han encontrado dosis similares a las toleradas por cosmos chocolate; en uva cv. 'Red Globe' la dosis óptima se reporta a los 18 Grays (Surakshitha et al., 2018), mientras que para *Tagetes erecta* y *Sesuvium portulacastrum* se estima en 20 Grays (Sarkar et al., 2016; Kapare et al., 2017). En algunas genotipos de *Helianthus tuberosus* L. se mencionan dosis de 22 y 27 Grays (Songsri, et al., 2019) mientras que para *Freesia armstrongii* W. Watson se reporta una dosis de 25 Grays (Xu et al., 2023).

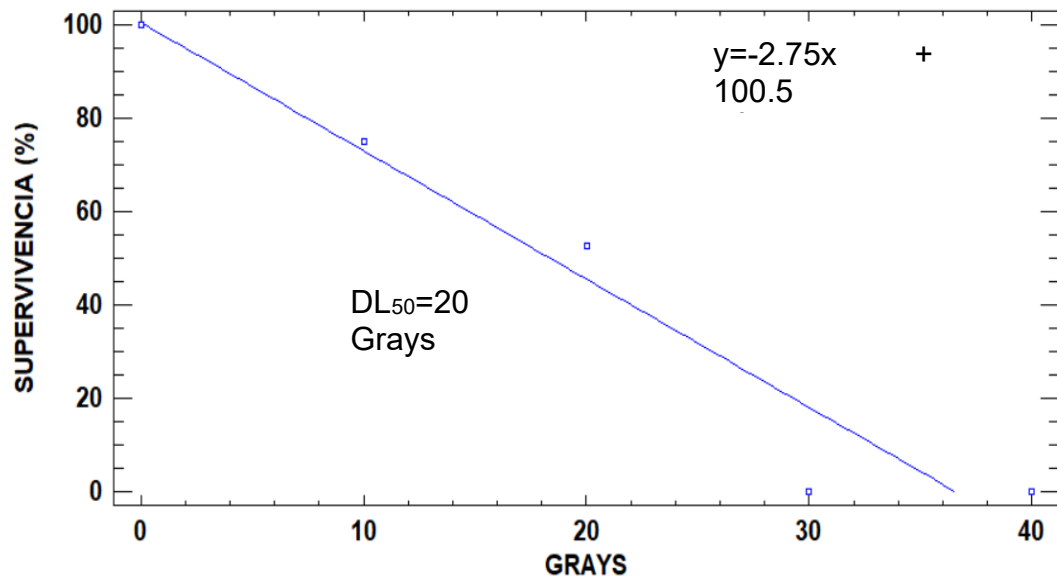


Figura 14. Dosis Letal Media (DL50) para la supervivencia de cosmos chocolate.

5.8 Conclusión

Los resultados demostraron que conforme la dosis aumenta, la supervivencia disminuye. Las dosis de 30 y 40 Grays fueron nocivas para cosmos chocolate con una mortalidad del 100% por lo que se determinó que la DL₅₀ se presentó en 20 Grays con un 52.5% de supervivencia de explantes.

5.9 Literatura citada

- Abdulhafiz, F., Kayat, F., & Zakaria, S. (2018). Effect of gamma irradiation on the morphological and physiological variation from *In vitro* individual shoot of banana cv. Tanduk (*Musa spp.*). *Journal of Plant Biotechnology*, 45(2), 140-145. <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.2.140>
- Alphonse, M., Thiagarajan, K., Fulzele, D. P., Pillay, M., Satdive, R. K., Kamble, S. N., Raina, R., Ramamoorthy, S., & Chandrasekaran, R. (2022). Effect of gamma radiation on gentiopicroside production in *Gentiana kurroo* Royle *in vitro* cultures. *Industrial Crops & Products*, 176, Article 114392. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114392>
- Antúñez-Ocampo, O. M., Cruz-Izquierdo, S., Sandoval-Villa, M., Santacruz-Varela, A., Mendoza-Onofre, L. E., de la Cruz-Torres, E., & Peña-Lomelí, A. (2017). Variabilidad inducida en caracteres fisiológicos de *Physalis peruviana* L. mediante rayos gamma ^{60}Co aplicados a la semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 211-218. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.2.211-218>
- Bravo, D. H. R., & Díaz-López, E. (2021). Variabilidad genética en raíz de girasol mediante gamma de ^{60}Co . *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 461-472. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2597>
- Castro-Castro, A., Vargas-Amado, G., Castañeda-Nava, J. J., Harker, M., Munguía-Lino, G., Santacruz-Ruvalcaba, F., & Rodríguez, A. (2017). Números cromosómicos para tres especies de *Cosmos* sección *Discopoda* (Asteraceae, Coreopsidae), con notas citogeográficas. *Acta Botánica Mexicana*, 118, 41-52. <http://dx.doi.org/10.21829/abm118.2017.1199>
- Chandrashekar, K. R. (2014). Gamma sensitivity of forest plants of Western Ghats. *Journal of Environmental Radioactivity*, 132, 100-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.02.006>
- Díaz-Juárez, R., Hernández-Arenas, M., Santacruz-Varela, A., Silva-Cifuentes, E. G., De la Cruz-Torres, E., Barrios-Gómez, E. J., Trejo-Pastor, V., & Muñoz-Orozco, A.

- (2022). Dosis altas de radiación gamma (Cobalto⁶⁰) disminuyen la expresión fenotípica de caracteres en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(4), 3694-3709. 10.34188/bjaerv5n4-021
- Elizar, I., Sinuraya, M., & Sipayung, R. (2018). The effect of gamma rays irradiation on the growth and flavonoid content of kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1116(5), Article 052020. 10.1088/1742-6596/1116/5/052020
- Gálvez-Marroquín, L. A., Avendaño-Arrazate, C. H., Ariza-Flores, R., Gomez-Simuta, Y., Martínez-Bolaños, M., & Cruz-López, J. A. (2023). Radiación gamma en semillas de Jamaica para inducir variación morfológica y selección de mutantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(5), 27-37. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i5.3010>
- Gupta, R., Wali, V. K., Bakshi, P., Singh, G., Shah, R. A., & Rani, S. (2018). Effects of gamma irradiation on shoot, root and survival percent in strawberry cv. Chandler under *in vitro* conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(3), 1173-1182. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.139>
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., de la Cruz-Torres, E., Fernández-Pavía, S. P., Martínez-Palacios, A., & Martínez-Trujillo, M. (2017). Determinación de la DL₅₀ y Gr₅₀ con rayos gamma (⁶⁰Co) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*. *Agrociencia*, 51(5), 507-524.
- Kapare, V., Satdive, R., Fulzele, D. P., & Malpathak, N. (2017). Impact of gamma irradiation induced variation in cell growth and phytoecdysteroid production in *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 919-930. 10.1007/s00344-017-9697-3
- Kaur, R., Kapoor, M., Kaur, R., & Kumar, A. (2017). Effect of gamma irradiation on cytomorphology, total phenolic content and antioxidant activity of calendula. *Journal of Hill Agriculture*, 8(4), 395-402. 10.5958/2230-7338.2017.00078.7

- Khalil, S. A., Ahmad, N., & Zamir, R. (2015). Gamma radiation induced variation in growth characteristics and production of bioactive compounds during callogenesis in *Stevia rebaudiana* (Bert.). *New Negatives in Plant Science*, 1(2), 1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neps.2015.06.002>
- Khan, S. A., Rahman, L. U., Verma, R., & Shanker, K. (2016). Physical and chemical mutagenesis in *Stevia rebaudiana*: variant generation with higher UGT expression and glycosidic profile but with low photosynthetic capabilities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2003-8>
- Martirena-Ramírez, A., Veitía, N., García, L. R., Collado, R., Torres, D., Rivero, L., & Ramírez-López, M. (2018). Dosis óptima de radiaciones gamma para la regeneración de plantas *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT-93'. *Biotecnología Vegetal*, 18(1), 21-29. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/572>
- Martirena-Ramírez, A., Veitía, N., García, L., Collado, R., Torres, D., Rivero, L., & Ramírez-López, M. (2015). Respuesta *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 9-15. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/5/3>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- na Ayudhaya, P. T., Konsanuk, S., & Vongvanrungrueng, A. (2022). Effect of acute gamma radiation on survival rate and morphological change from seed of *Cosmos sulphureus* Cav. *Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University*, 41(1), 108-118.
- Olasupo, F. O., Ilori, C. O., Forster, B. P., & Bado, S. (2016). Mutagenic effects of gamma radiation on eight accessions of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *American Journal of Plant Sciences*, 7(2), 339-351. [10.4236/ajps.2016.72034](https://doi.org/10.4236/ajps.2016.72034)

- Pallavi, B., Nivas, S. K., D'souza, L., Ganapathi, T. R., & Hegde, S. (2017). Gamma rays induced variations in seed germination, growth and phenotypic characteristics of *Zinnia elegans* var. Dreamland. *Advances in Horticultural Science*, 31(4), 267-273. 10.13128/ahs-20289
- Rene, Y. A., Rashid, K., Tajudin, A., Zainoldin, K. H., Daran, A. B., Nezhadahmadi, A., & Golam, F. (2014). The contribution of muslim scientists in botanical science: studies on the using of gamma rays for ginger plants (*Zingiber officinale*). *Stem Cell*, 5(4), 88-94. 10.7537/marsscj050414.10
- Rojas, V. P., Aguirre, P., Durán, O., & Nario, A. (2018). Aplicaciones de tecnologías nucleares en conservación y mejoramiento genético forestal bajo un escenario de cambio climático. *Ciencia & Investigación Forestal INFOR*, 24(3), 116-127. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2018.506>
- Salomón, J. L., González, M. C., Castillo, J., & Varela, M. (2017). Comportamiento de barna, cultivar de papa (*Solanum tuberosum* L.) ante diferentes dosis de rayos gamma de fuente cobalto 60. *Cultivos Tropicales*, 38(4), 127-130. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362017000400001&script=sci_arttext&tlng=pt
- Sarkar, J., Singh, S. K., Singh, K. P., & Guha, S. K. (2016). *In-vivo* and *in-vitro* mutagenesis in marigold (*Tagetes erecta*) using ^{60}Co gamma rays. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86(7), 870-875.
- Serrano-Fuentes, M. K., Gómez-Merino, F. C., Cruz-Izquierdo, S., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2022). Gamma radiation (^{60}Co) induces mutation during *in vitro* multiplication of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Horticulturae*, 8(6), Article 503. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060503>

- Songsri, P., Jogloy, S., Holbrook, C. C., & Puangbut, D. (2019). Determination of lethal dose and effect of gamma rays on growth and tuber yield of jerusalem artichoke mutant. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 51(1), 1-11. <https://sabraojournal.org/determination-of-lethal-dose-and-effect-of-gamma-rays-on-growth-and-tuber-yield-of-jerusalem-artichoke-mutant/>
- Surakshitha, N. C., Ganga, M., & Soorianathasundaram, K. (2018). Radio-sensitivity of nodal segments of grape cv. 'Red Globe' to gamma rays under *in vitro*. *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 776-781.
- Xu, W., Wang, D., Matina, P., Lin, B., Liu, J., Huang, J., & Li, X. (2023). Biological effect of gamma and electron beam to target turning X-ray irradiation on two varieties of *freesia* in M₃ generation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 16(3), Article 100622. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2023.100622>

6. EFECTO DE SUSTRATOS, RAÍZ Y APLICACIÓN DE MICORRIZAS EN LA ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus*) OBTENIDAS *in vitro*

6.1 Resumen

La aclimatación de plantas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus*) es la etapa final que determina el éxito del cultivo *in vitro*. Algunos de los principales factores que se consideran determinantes para este logro son la elección de sustratos correctos para la especie, el enraizamiento previo y las condiciones posteriores a las que se expone el cultivo. En referencia a lo anterior, durante la aclimatación de estas plantas, se evaluaron mezclas de perlita, peat moss y tezontle en diferentes proporciones, la presencia/ausencia de raíz generada *in vitro* previo al proceso de adaptación y la aplicación de micorrizas. Tras una evaluación en condiciones de invernadero se observó que no existieron diferencias significativas entre la composición de los sustratos y tampoco se presentaron efectos de la aplicación de micorrizas. Por otra parte, el enraizamiento previo *in vitro* benefició el crecimiento de las plantas ya que su presencia generó aquellas de mayor tamaño con un rango de 15.26 cm de longitud. En el caso de la supervivencia obtenida, los mayores porcentajes, desde el 33.33% hasta el 100% también se manifestaron en aquellas plantas enraizadas, mientras que las que no presentaron raíz en la etapa de laboratorio, fueron más susceptibles a morir durante la adaptación y su supervivencia fue desde el 0% hasta el 33.33%. No se observó una interacción entre los factores evaluados, por lo que estas respuestas reflejaron la importancia que representa principalmente la existencia de la raíz en el éxito de la adaptación de cosmos chocolate.

Palabras clave: aclimatación, adaptación, *ex vitro*, raíz, supervivencia

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Rosa Isela Martínez Contreras
Directora: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

EFFECT OF SUBSTRATES, ROOTS, AND MYCORRHIZAL APPLICATION ON THE ACCLIMATIZATION OF CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus*) PLANTS OBTAINED *in vitro*

6.2 Abstract

The acclimatization of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) plants is the final stage that determines the success of *in vitro* cultivation. Some of the main factors considered crucial for this achievement are the selection of suitable substrates for the species, prior rooting, and the post-cultivation conditions to which the plants are exposed. In this regard, during the acclimatization of these plants, different mixtures of perlite, peat moss, and tezontle in various proportions were evaluated, along with the presence or absence of *in vitro* generated roots before the adaptation process and the application of mycorrhizae.

After an evaluation under greenhouse conditions, no significant differences were observed regarding substrate composition, nor were there any effects from mycorrhizal application. However, prior *in vitro* rooting favored plant growth, as rooted plants were larger, reaching a length of 15.26 cm. In terms of survival rates, the highest percentages, ranging from 33.33% to 100%, were also observed in rooted plants. In contrast, plants that lacked roots during the laboratory stage were more susceptible to mortality during adaptation, with survival rates ranging from 0% to 33.33%. No interaction was observed between the evaluated factors, indicating that the presence of roots is the primary factor influencing the successful adaptation of chocolate cosmos.

Keywords: acclimatization, adaptation, *ex vitro*, root, survival.

Thesis of Master in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Rosa Isela Martínez Contreras
Advisor: Dra. Ma Teresa Martínez Damián

6.3 Introducción

Se considera que la aclimatación de plantas obtenidas en cultivo de tejidos es una de las etapas más críticas del proceso por lo que este paso funciona como un cuello de botella entre el material *in vitro* y el que llega a la supervivencia *ex vitro* (Bonilla et al., 2015). Particularmente para el cultivo de cosmos chocolate una vez que se lleva a condiciones de invernadero, es recomendable que durante todo el ciclo de vida se mantenga bajo cubiertas que lo protejan de la luz directa del sol ya que en su hábitat natural estas plantas suelen tener un crecimiento bajo sombra (Morales-Vázquez et al., 2024). Dentro de las condiciones del sustrato que requiere esta especie, Gómez-Pedraza et al. (2024) hacen mención sobre la adaptabilidad que tienen en suelos bien drenados y poco fértiles sin necesidad de una preparación previa del suelo. Este factor debe ser considerado durante esta etapa ya que el uso de un sustrato correcto facilita la obtención de plantas de calidad y con este fin es común que se encuentren diferentes mezclas de materiales con características diferentes como sólidos o porosos y con diferentes orígenes como el natural o el sintético (Pineda et al., 2018). Debido a las dificultades que este proceso puede presentar, además de requerirse un sustrato adecuado, también se ha recurrido al uso de algunas alternativas que garanticen un éxito mayor, como es el caso de la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que permiten la asociación simbiótica mutualista no específica con el 90% de las plantas vasculares (Castillo et al., 2016). El uso de micorrizas en plantas obtenidas en laboratorio favorece el crecimiento, estado nutricional y genera un aumento de la resistencia, beneficio que se ve reflejado en la longitud de raíces y de la planta (Escaleras-Medina et al., 2022). El objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia y el efecto de diferentes combinaciones de sustratos, así como la aplicación de micorrizas y la presencia de raíz durante la etapa de aclimatación de plantas de cosmos chocolate obtenidas *in vitro*.

6.4 Materiales y métodos

Parte de las plantas obtenidas *in vitro* y que no fueron sometidas a radiación se utilizaron para llevarse a condiciones *ex vitro* y así observar su supervivencia y comportamiento. Se evaluó el efecto de tres factores diferentes para esta etapa. Inicialmente, fue la composición de los sustratos en donde fueron utilizados tres distintos; el primero con una composición de peat moss y perlita en proporciones 70-30 respectivamente, el segundo compuesto por peat moss- perlita- tezontle en proporciones 70-20-10 respectivamente y el tercero con peat moss y tezontle igualmente en proporciones 70-30. El segundo factor fue la presencia y ausencia de raíz de las plantas generada previamente *in vitro* y el tercero constó en la aplicación de un consorcio micorrícico conformado por especies de los géneros *Glomus*, *Acaulospora* y *Gigaspora*. Con las consideraciones anteriores se obtuvo un total de 12 tratamientos diferentes con 3 repeticiones para cada uno. Los tratamientos obtenidos se presentan en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Tratamientos para enraizamiento de cosmos chocolate

SUSTRATOS	CON RAÍZ	SIN RAÍZ
70-30 perlita	1. Con micorriza	7. Con micorriza
70-30 perlita	2. Sin micorriza	8. Sin micorriza
70-20-10	3. Con micorriza	9. Con micorriza
70-20-10	4. Sin micorriza	10. Sin micorriza
70-30 tezontle	5. Con micorriza	11. Con micorriza
70-30 tezontle	6. Sin micorriza	12. Sin micorriza

Primeramente, a las 36 plantas se les retiraron por completo los restos de agar con agua corriente. Posteriormente se dividieron aquellas con y sin raíz (Figura 15-a) y se colocaron en macetas de plástico de 3 pulgadas con medio litro de los sustratos correspondientes para cada una. A las 18 plantas seleccionadas para la aplicación de micorrizas, se les incorporaron 500 mg de la formulación PROMIX MICORRIZAS; posteriormente, se creó un microambiente para mantener la humedad con bolsas transparentes de polietileno y un popote de

plástico para conservarlas rígidas. A cada bolsa se le realizó un pequeño corte en una esquina para permitir un ligero intercambio gaseoso. Fueron colocadas dentro del laboratorio, cercanas a una ventana donde la iluminación no llegara de manera directa a lo largo del día (Figura 15-b), la temperatura del laboratorio se encontró alrededor de los 25° C y la humedad relativa entre el 50 y 60%. Cuatro días posteriores se realizó otro corte en la otra esquina de la bolsa para continuar con la adaptación progresiva. A los 8 días, se realizó el corte total de la parte superior de la bolsa. Finalmente, a los 12 días, las plantas fueron destapadas por completo y colocadas en un sitio donde el sol comenzara a llegar de una manera directa dentro del mismo laboratorio (Figura 15-c). 15 días después, las plantas que sobrevivieron fueron llevadas a condiciones de invernadero (Figura 15-d). Durante la semana posterior, las plantas no presentaron estrés al cambiar de sitio y continuaron con un crecimiento normal. Sin embargo, más adelante la supervivencia disminuyó. Las variables que se consideraron para la evaluación fueron: la tasa de supervivencia, la longitud de la planta y el número de hojas, los datos fueron tomados a los 20 días. Transcurrido un mes de aclimatación, se realizó una toma de fotografías de la raíz antes de colocarlas en macetas más grandes para su desarrollo completo y a los 2 meses y medio se tomaron fotos de las plantas adultas que lograron aclimatarse totalmente.

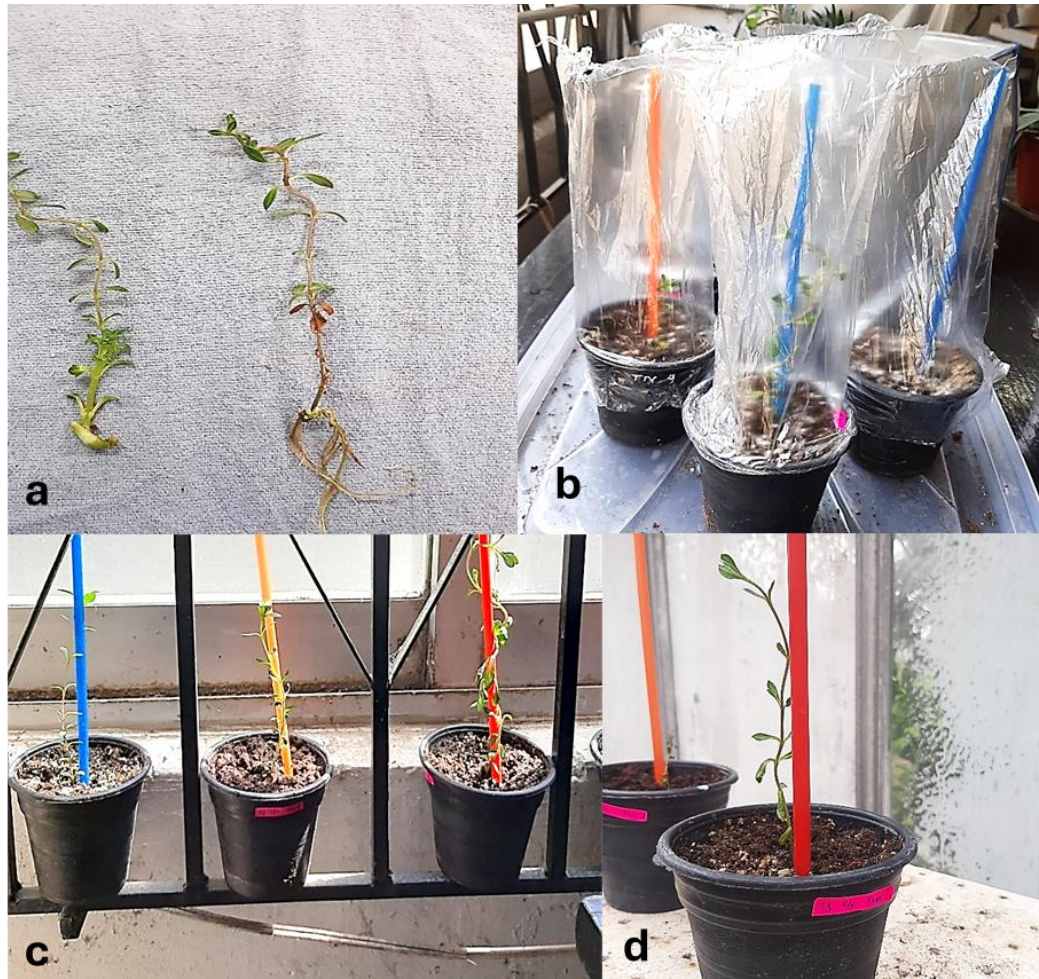


Figura 15. a- separación de plantas con presencia/ausencia de raíz; b- primer día de aclimatación con luz indirecta dentro del laboratorio; c- 12 días, plantas completamente destapadas con mayor luz directa; d- 15 días, plantas en condiciones de invernadero.

6.5 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial con un total de 12 tratamientos. Se consideraron tres factores; el primero, sustratos (3 niveles); el segundo, raíz (2 niveles) y el tercero, micorrizas (2 niveles). La unidad experimental fue cada planta, con un total de 36 y tres repeticiones para cada tratamiento.

6.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4. Se realizó de manera no paramétrica mediante rangos del estadístico de Friedman ($p \leq 0.05$) y se obtuvieron porcentajes de supervivencia.

6.7 Resultados y Discusión

6.7.1 Efecto de diferentes sustratos en la aclimatación de cosmos chocolate

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el estadístico de Friedman para el factor sustrato, no existieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos variables evaluadas (Cuadro 21), a pesar de que el tipo de sustrato que se utiliza en la aclimatación es de vital importancia para la supervivencia de plantas, especialmente para aquellas que vienen de un entorno *in vitro*, en este caso las mezclas utilizadas pudieron influir en una aireación y absorción de agua y nutrientes de manera semejante en las tres mezclas, debido a que en todos los casos se utilizó cierto porcentaje de sustratos porosos (perlita y tezontle) por lo que no se observaron cambios significativos en algún tratamiento. El empleo de peat moss en todos los sustratos también pudo contribuir a que no se presentara una diferencia pues les confirió características similares; se ha hecho referencia a que el contenido de materia orgánica favorece la nutrición, retención de agua, el intercambio catiónico y disponibilidad de nutrientes (Yescas et al., 2016). Con relación a las características previamente mencionadas, para el caso particular de cosmos chocolate el porcentaje de peat moss utilizado pudo ser perjudicial en el crecimiento ya que se menciona que la especie puede producir plantas débiles con suelos ricos en nutrientes o fertilizados (Gómez-Pedraza et al., 2024). El sustrato suele ser de particular importancia para el anclaje de plantas y nutrición, sin embargo, cosmos chocolate muestra que no requiere de alguno específico para su crecimiento, pero si se deben considerar favorables aquellos con poco contenido de materia orgánica y

de suelos bien drenados. Las características de los sustratos y sus combinaciones deben ser elegidos correctamente pues el crecimiento de la raíz se relaciona inversamente con la resistencia a la penetración del suelo y como consecuencia puede haber disminución del crecimiento de las plantas (Osorio et al., 2017), tal como se reflejó en cosmos chocolate.

Cuadro 21. Respuesta de cosmos chocolate a sustratos en la aclimatación de plantas *in vitro* mediante rangos del estadístico de Friedman

SUSTRATO	LONGITUD cm	NÚMERO DE HOJAS
1	9.06 a ^z	7.25 a
2	14.71 a	4.80 a
3	12.56 a	5.50 a
DMS	7.25	11.34
Media obtenida	12.00	5.50

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

6.7.2 Efecto de la presencia/ ausencia de raíz durante la aclimatación de cosmos chocolate

El factor raíz en este caso si presentó una diferencia significativa para la variable longitud. Este factor se considera crucial porque asegura la autotrofia de las vitroplantas y se ha comprobado que para obtener mejores resultados el desarrollo radicular *in vitro* es importante (Sánchez et al., 2020; Criollo et al., 2016). Se observó que aquellas plantas en las que se generó un enraizamiento *in vitro* previo, respondieron de manera positiva al presentar valores mayores con una media de 15.16 cm de longitud mientras que aquellas que se aclimataron sin raíz fueron más propensas a generar plantas de menor tamaño (Cuadro 22). La inducción de raíces, además, es considerada como una forma de aclimatación *in vitro* en la que el material vegetal se prepara para resistir el cambio causado por el estrés *ex vitro* (Mosqueda et al., 2017). En el caso del número de hojas, no existió ninguna diferencia entre las plantas con y sin raíz ya que obtuvieron el mismo valor de la media registrada en el análisis (Cuadro 22). Además de la importancia de la producción de raíces antes de la aclimatación, también se

consideran importantes las características de las mismas; Soares & Miranda (2016) refieren que aquellas raíces gruesas, cortas y poco ramificadas no son recomendables para la aclimatación por la ineficiencia que presentan en la absorción de agua y nutrientes.

Cuadro 22. Respuesta de cosmos chocolate al factor raíz en la aclimatación de plantas *in vitro* mediante rangos del estadístico de Friedman

RAÍZ	LONGITUD cm	NÚMERO DE HOJAS
Si	15.26 a ^z	5.50 a
No	7.75 b	5.50 a
DMS	5.96	14.40
Media obtenida	12.00	5.50

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

6.7.3 Efecto de la incorporación de micorrizas en la aclimatación de cosmos chocolate

Al igual que en el factor sustrato no se obtuvo alguna diferencia significativa en la longitud y el número de hojas con la aplicación de micorrizas. El comportamiento fue similar en ambas variables ya que se presentaron medias semejantes (Cuadro 23). En otros casos la asociación simbiótica crea efectos positivos y genera plantas más resistentes, sin embargo, no se encontró ese efecto en estos resultados. Existen investigaciones exitosas donde su aplicación resulta favorable, en múltiples ocasiones la colonización de raíces con micorrizas suele mejorar el manejo del agua, estado nutricional y la resistencia a enfermedades (Shiwani et al., 2022); en cosmos chocolate no se mostró este efecto con la dosis seleccionada. Estos resultados difieren de los obtenidos por Dewir et al. (2024) quienes confirmaron que los parámetros de longitud y número de hojas en rosa Al-Taif obtuvieron valores mayores con la aplicación de micorrizas; esto mismo se observó en el cultivo de la especie *Capsicum annuum* donde se ha comprobado que el uso de especies del género *Glomus* y *Acaulospora* por separado presentan los mejores resultados de altura (Rojas,

2014). La especie *Stevia rebaudiana* Bertoni ha mostrado un efecto positivo en la incorporación de micorrizas con una especie diferente (*Rhizogloium irregulare*), a las utilizadas en este estudio (Almaguer-Ricardo et al., 2023).

Cuadro 23. Respuesta de cosmos chocolate a la incorporación de micorrizas en la aclimatación de plantas *in vitro* mediante rangos del estadístico de Friedman

MICORRIZA	LONGITUD cm	NÚMERO DE HOJAS
Si	12.95 a ^z	6.50 a
No	11.12 a	4.50 a
DMS	5.91	8.64
Media obtenida	12.00	5.50

^z Letras diferentes en la media son estadísticamente significativas. Prueba de Friedman ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa

6.7.4 Supervivencia de cosmos chocolate en condiciones de invernadero

Conforme transcurrieron los días, el porcentaje de supervivencia disminuyó y en algunos tratamientos la pérdida de material fue total (Cuadro 24). Los primeros días las plantas no presentaron daños, sin embargo, con el paso del tiempo comenzaron a mostrar estrés principalmente por la exposición al incremento de temperatura, ya que la deshidratación fue el principal efecto negativo observado. Espinoza-Reyes et al. (2019) mencionan que la supervivencia también se ve reflejada de acuerdo con el tamaño y la buena calidad de las vitroplantas durante la aclimatación. Por otra parte, se considera que las principales desventajas que presentan las plantas *in vitro* son la presencia de hojas delgadas con poco desarrollo de cutícula, raíces ineficientes, baja actividad fotosintética, baja funcionalidad estomática y poco control de la transpiración dificultando su supervivencia en condiciones de ambiente *ex vitro* (Enriquez-del Valle et al., 2024). Los porcentajes de supervivencia obtenidos a los 21 días, mostraron que en los tratamientos 3 y 4 sobrevivieron todas las plantas mientras de manera opuesta existió una pérdida completa de plantas en los tratamientos 7, 8 y 12. Los porcentajes más altos de supervivencia se registraron en los sustratos con composición de peat moss- perlita- tezontle en proporciones 70-20-10, mientras

que dos de las pérdidas totales se registraron en el sustrato de peat moss- perlita en proporción 70-30 y una en sustrato peat moss- tezontle en proporción 70-30. Lo anterior indica que a pesar de que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los sustratos, se presentó una coincidencia de pérdida de material de acuerdo a la composición del sustrato; en el caso de la micorriza aplicada particularmente a los tratamientos mencionados con mayores y menores porcentajes de supervivencia, no existió algún patrón, pues tanto en los tratamientos exitosos como negativos se presentaron ambas situaciones, con y sin el empleo de micorrizas. De manera semejante se ha mencionado que el hecho de no presentarse un efecto en este factor principal puede deberse a la escasa compatibilidad entre la especie estudiada y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Hernández-Lamasa et al., 2015). Por otra parte, existe una discrepancia en el caso de la raíz, pues se observó que coincide con el análisis estadístico ya que si existió una diferencia notable en la supervivencia; en el Cuadro 24, se puede observar como en los tratamientos 3 y 4 con 100% de supervivencia, la raíz estuvo presente mientras que en los tratamientos 7, 8 y 12 se utilizaron plantas que no contaban con raíz y el porcentaje de supervivencia fue 0%. Esta respuesta observada corresponde a resultados obtenidos en *Rubus idaeus* L. donde la supervivencia de plantas con raíz fue notoriamente superior que aquellas con un enraizamiento *ex vitro* únicamente (Lebedev et al., 2018). El éxito de la adaptación de *Cosmos* estuvo influido positivamente por las raíces, sin embargo, también se considera que el desarrollo de brotes funcionales, el incremento de la resistencia a la pérdida de agua y el ataque a patógenos es fundamental (Indacochea-Ganchozo et al., 2017).

Mediante la extracción de las plantas de los contenedores después de un mes de aclimatación, se observaron las raíces de algunos tratamientos. La Figura 16-a correspondiente al T2 y mostró que el crecimiento radicular se desarrolló de manera normal a pesar de no contar con la aplicación de micorrizas. La Figura 16-b corresponde al T3, que presentó una cantidad similar de raíz al anterior y en este caso si se le realizó una aplicación, además, fue uno de los tratamientos con mayor supervivencia. La presencia de tezontle en este sustrato pudo haber

influido debido a la mayor dificultad de la raíz para extenderse a lo largo del sustrato comparado con el que solo contenía perlita. Luna-Fletes et al. (2021) mencionan que el tezontle puede inhibir el crecimiento y desarrollo de plantas por tener menor disponibilidad de agua por lo que las propiedades físicas juegan un papel importante. La Figura 16-c representa el T4 que al igual que el T3, se estableció en el mismo sustrato y también presentó raíz, pero no se le aplicó micorriza. Pese a no contar con micorrizas y haber generado una menor cantidad de raíces, el éxito de este tratamiento también se consideró de los mejores de acuerdo con las plantas que lograron desarrollarse. La Figura 16-d muestra el T11; en este caso, contrario a los anteriores, representa a las plantas que no contaban con raíz y que lograron crecer al combinarse con micorrizas. El enraizamiento fue mayor al T4 aunque fue notoria la diferencia de desarrollo en contraste con el T2 y T3 que previamente ya presentaban raíces.

Finalmente, algunos de los tratamientos que lograron una aclimatación efectiva en contenedores más grandes, presentaron plantas adultas con un desarrollo completamente normal a pesar de que el crecimiento fue lento. Una de las principales características que pueden desarrollar las plantas aclimatadas con éxito en el invernadero, es la generación de hojas con una diferenciación del mesófilo de empalizada y el mesófilo esponjoso, un tegumento cuticular y un aparato estomático bien desarrollado permitiéndole una transpiración normal (Kutas & Ogorodnyk 2015). Se observó que la mayoría de las plantas alcanzaron la generación de brotes nuevos, pero no la iniciación de la floración (Figura 17).

Cuadro 24. Porcentajes de la supervivencia de cosmos chocolate durante la aclimatación.

TRATAMIENTO	SUSTRATO	MICORRIZA	RAÍZ	% SUPERVIVENCIA
1	70-30 perlita	Si	Si	66.66%
2	70-30 perlita	No	Si	33.33%
3	70-20-10	Si	Si	100%
4	70-20-10	No	Si	100%
5	70-30 tezontle	Si	Si	33.33%
6	70-30 tezontle	No	Si	66.66%
7	70-30 perlita	Si	No	0%
8	70-30 perlita	No	No	0%
9	70-20-10	Si	No	33.33%
10	70-20-10	No	No	33.33%
11	70-30 tezontle	Si	No	33.33%
12	70-30 tezontle	No	No	0%

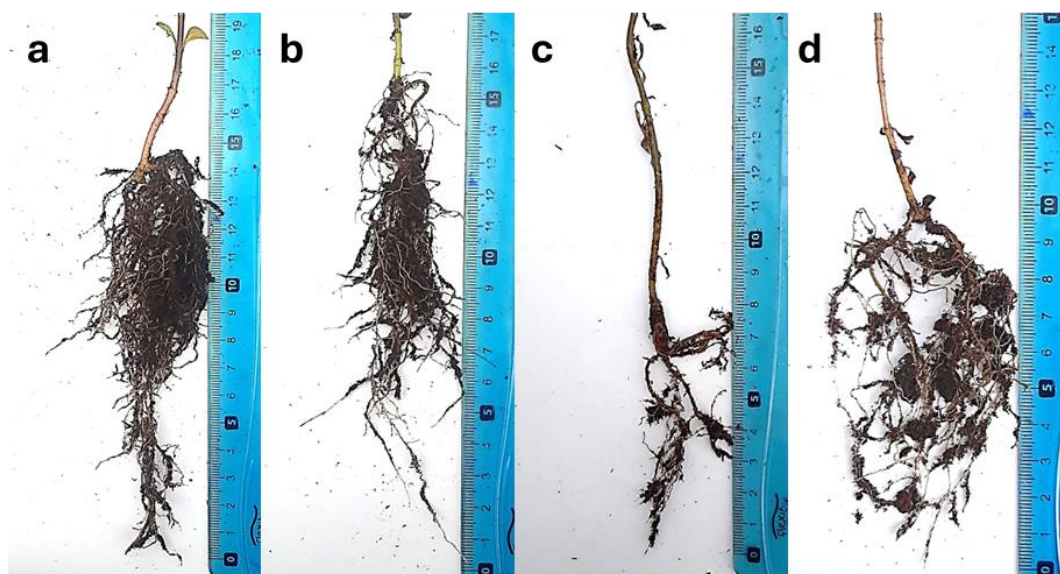


Figura 16. Enraizamiento de cosmos chocolate transcurrido un mes de aclimatación. a- T2; b- T3; c- T4; d- T11.

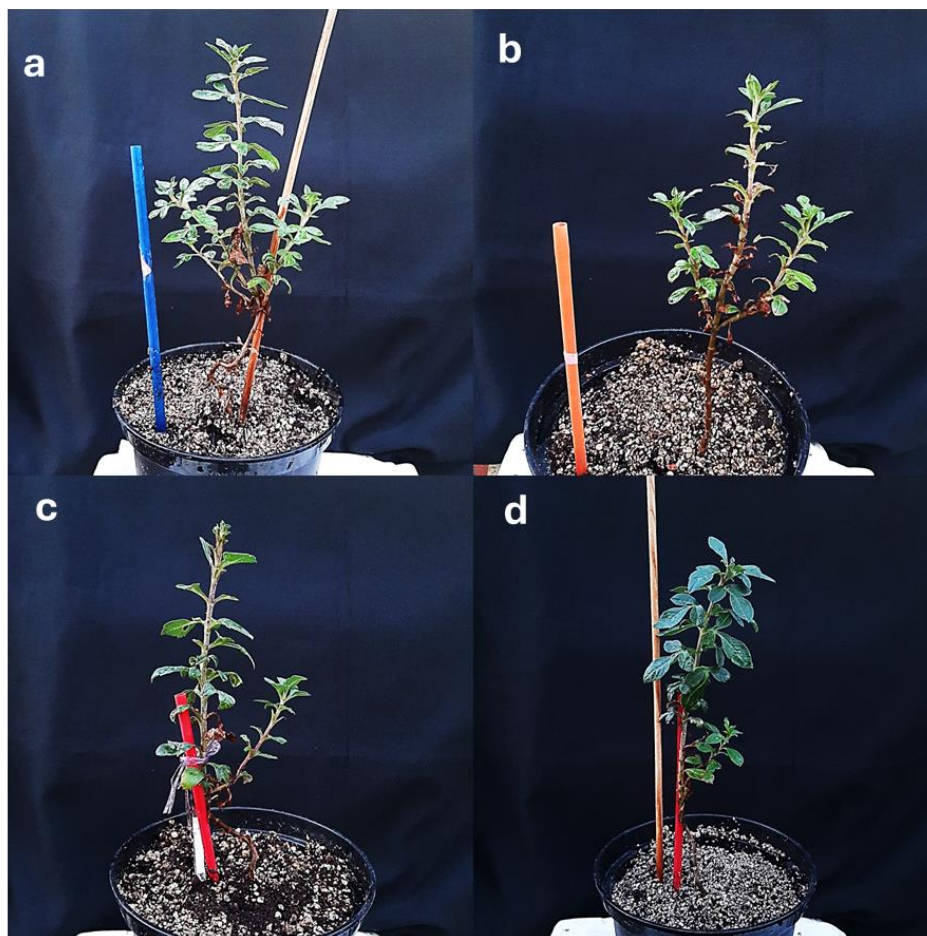


Figura 17. Plantas de cosmos chocolate aclimatadas con éxito posterior a dos meses y medio. a-T1; b- T4; c- T5; d-T11.

6.8 Conclusión

La composición de los sustratos y la aplicación de micorrizas no presentaron algún efecto significativo. La supervivencia en su mayoría fue afín con aquellas plantas que previamente habían generado raíces *in vitro* confiriéndoles ventajas de adaptación, con lo que se comprobó que la presencia de raíz es importante para un buen desarrollo de plantas en la aclimatación.

6.9 Literatura citada

- Almaguer-Ricardo, Y., Mujica-Pérez, Y., & Terry-Alfonso, E. (2023). Response of *Stevia rebaudiana* Bertoni to the strains inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Cultivos Tropicales*, 44(4), Article e06. <https://cu-id.com/2050/v44n4e06>
- Bonilla, M. M., Sánchez, O. S. & Pachón G. J. (2015). Evaluación de sustratos orgánicos para la aclimatación y endurecimiento de vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2), 31-36. 10.22490/21456453.1402
- Castillo, S. A., Montañez, M. A., Docampo, R. R., Rodríguez, B. P., Cabrera, B. D., & Zoppolo, G. R. (2016). Micorrización de portainjertos de manzano micropropagados. *Cultivos Tropicales*, 37, 7-12. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.1451.4804>
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252-261. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>
- Dewir, Y. H., Al-Ali, A. M., Al-Obeed, R. S., Habib, M. M., Malik, J. A., Alshahrani, T. S., Al-Qarawi, A. A., & Murthy, H. N. (2024). Biological acclimatization of micropropagated al-taif rose (*Rosa damascena* f. *trigintipetala* (Dieck) R. Keller) plants using arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizophagus fasciculatus*. *Horticulturae*, 10(10), Article 1120. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10101120>
- Enríquez-del Valle, J. R., Chávez-Cruz, I. L., Rodríguez-Ortiz, G., & Campos-Angeles, G. V. (2024). Vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. Obtenidas en ambientes de incubación contrastantes, aclimatadas en diferentes sustratos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 46(3), 291-298. <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.3.298>

- Escaleras-Medina, J. C., Herrera, S. E. C., & Sánchez-Urdaneta, A. B. (2022). Aclimatización de vitroplantas de banano con hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Científica Agroecosistemas*, 10(2), 15-23.
- Espinosa-Reyes, Á., Silva-Pupo, J. J., Bahi-Arevich, M., & Romero-Cabrera, D. (2019). Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 42(1), 23-29.
- Gómez-Pedraza, D. E., Álvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2024). Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff): una especie ornamental endémica y poco valorada en México. *CIENCIA ergo-sum*, 31, 1-17. <https://doi.org/10.30878/ces.v31n0a25>
- Hernández-Lamasa, C., Ayala, C. C., Vergara-Córdova, C., Araméndiz-Tatis, H. & Velázquez-Arteaga, R. (2015). Efecto de coberturas y micorrizas nativas sobre el cultivo de berenjena (*solanum melongena* L.). *Agronomía*, 23(1), 7-19. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/agronomia/article/view/16>
- Indacochea-Ganchozo, B., Parrales-Villacreses, J., Castro-Piguave, C., Vera-Tumbaco, M., & Gabriel-Ortega, J. (2017). Aclimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 124-134. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9532243>
- Kutas, E., & Ogorodnyk, L. (2015). Acclimatization results of micro-propagated plantlets. *African Journal of Plant Science*, 9(3), 124-127. <http://doi.org/10.5897/AJPS2015.1274>
- Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I., & Shestibratov, K. (2018). Effects of growth regulators and gelling agents on *ex vitro* rooting of raspberry. *Plants*, 8(1), Article 3. <https://doi.org/10.3390/plants8010003>
- Luna-Fletes, J. A., Cruz-Crespo, E., & Can-Chulim, Á. (2021). Pumice, tezontle and nutritive solutions in cherry tomato crop. *Terra Latinoamericana*, 39, Article e781. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.781>

- Morales-Vázquez, B., Colinas-León, M. T., Mejía-Muñoz, J. M., Juárez-Hernandez, M. J., Martínez-Damián, M. T., & Martínez-Solís, J. (2024). Dulce Amanecer, primera variedad mexicana de cosmos chocolate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 47(2), 217-219. <https://doi.org/10.35196/rfm.2024.2.217>
- Mosqueda, F. O., Escalona, M. M., Teixeira da Silva, J. A., Pina, M. D., & Daquinta, G. M. (2017). *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129, 543-551. 10.1007/s11240-017-1186-7
- Osorio, M. A., Leiva, E. I., & Ramírez, P. R. (2017). Crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes tamaños de contenedor. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(2), 73-82. <https://doi.org/10.22267/rcia.173402.73>
- Pineda, R. E., Acosta, H. F., Fernández, D. I., Núñez, J. D., Hernández, F. A. R., Aday, D. O., Occeguera, A. Z., Machado, A. P., Jiménez, V. M., Toledo, R. E., & Más, M. R. (2018). Nuevo sustrato para la aclimatización de vitroplantas de caña de azúcar. *Centro Agrícola*, 45(3), 32-36. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852018000300032&script=sci_arttext
- Rojas, M. L. E. (2014). Respuesta del cultivo de pimentón (*Capsicum annuum*) a la inoculación con *Glomus manihotis* y *Acaulospora lacunosa* en suelo con niveles alto de fósforo. *Respuestas*, 19(1), 27-38. <https://doi.org/10.22463/0122820X.6>
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1593-1605. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- Shiwani, K., Sharma, D., & Kumar, A. (2022). Improvement of plant survival and expediting acclimatization process. In S. Gupta, & P. Chaturvedi (Eds.), *Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops* (pp. 277-291). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_12

- Soares, B. D. O., & Miranda, V. S. (2016). Rooting *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of citrus cultivars. *Revista de Ciencias Agrarias, Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 59(2), 144-151. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2119>
- Yescas, A. E., Campos, A. G, Enríquez del Valle, J. R., Velasco, V. A., Rodríguez, O. G., & Ruiz, L. J. (2016). Aclimatación de *Agave americana* var. *oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 911-922. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n4/2007-0934-remexca-7-04-00911-en.pdf>