



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA



**VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN LA MULTIPLICACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO *In vitro* DE CLONES SILVESTRES DE
COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.)**

TESIS

Que como requisito parcial

para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta

BULMARO MORALES VÁZQUEZ

Bajo la supervisión de: JUAN MARTÍNEZ SOLÍS, DR.

**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**



Chapingo, Estado de México, junio del 2018.

VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN LA MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO
In vitro* DE CLONES SILVESTRES DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos
***atrosanguineus* Sherff.)**

Tesis realizada por Bulmaro Morales Vázquez, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



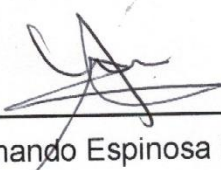
DIRECTOR:

Dr. Juan Martínez Solís



ASESOR:

M. C. José Merced Mejía Muñoz



ASESOR:

M. C. Amando Espinosa Flores

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
DEDICATORIA	IX
AGRADECIMIENTOS.....	X
DATOS BIOGRÁFICOS.....	XI
RESUMEN GENERAL.....	XII
GENERAL ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 El género <i>Cosmos</i> y su importancia en la floricultura.....	3
2.2 Propiedades nutraceuticas de algunas especies del género <i>Cosmos</i>	4
2.3 <i>Cosmos atrosanguineus</i> , especie y descripción.....	5
2.4 Situación actual de <i>Cosmos atrosanguineus</i> y su uso comercial	6
2.5 Estudios de la micropropagación de <i>Cosmos atrosanguineus</i>	7
2.6 El papel de los fitorreguladores en el cultivo de tejidos	8
2.6.1 Citocininas	8
2.6.2 Auxinas	9

2.6.3	Cofactores en el enraizamiento	11
2.7	Fotoperiodo	12
2.8	Literatura citada.....	13
3.	VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN CLONES SILVESTRES DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i> Sherff) DURANTE SU MICROPROPAGACIÓN: ETAPA II MULTIPLICACIÓN.	18
3.1	Resumen	18
3.2	Abstract	19
3.3	Introducción	20
3.4	Materiales y métodos	21
3.4.1	Ubicación de los experimentos y material vegetal utilizado	21
3.4.2	Organogénesis indirecta	22
3.4.3	Organogénesis directa.....	23
3.4.4	Respuesta al fotoperiodo en la obtención de brotes	24
3.4.5	Diseño experimental	24
3.5	Resultados y discusión.....	24
3.5.1	Organogénesis indirecta	24
	Respuesta de los segmentos nodales y de hoja de cosmos chocolate en la formación de callo con 2,4-D.	24
	Respuesta de los segmentos de hoja y nudos de cosmos chocolate en la formación de callos con BA	25

3.5.2	Organogénesis directa; respuesta de los 5 clones silvestres en la formación de brotes a partir de segmentos nodales	27
3.5.3	Respuesta al fotoperiodo en la obtención de brotes con segmentos nodales de cosmos chocolate	35
3.6	Conclusiones	38
3.7	Recomendaciones	38
3.8	Literatura citada	39
4.	VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN CLONES SILVESTRES DE COSMOS CHOCOLATE (<i>Cosmos atrosanguineus</i> sherff.) DURANTE su MICROPROPAGACIÓN: ETAPA III ENRAIZAMIENTO	41
4.1	Resumen	41
4.2	Abstract	42
4.3	Introducción	43
4.4	Materiales y métodos	44
4.4.1	Ubicación de los experimentos y material vegetal utilizado	44
4.4.2	Pruebas con sacarosa	45
4.4.3	Pruebas con floroglucinol	45
4.4.4	Tratamientos con fotoperiodo	46
4.4.5	Variables evaluadas	46
4.4.6	Diseño experimental	46
4.5	Resultados y discusión	47

4.5.1	Respuesta del floriglucinol en el enraizamiento	47
4.5.2	La sacarosa y su efecto en el enraizamiento	49
4.5.3	Efecto del fotoperíodo en el enraizamiento	51
4.6	Conclusiones	54
4.7	Literatura citada.....	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Clon Hgo 1, obtención de callos con 2,4-D en segmentos de hoja. .	25
Cuadro 2.	Clon Hgo 5, obtención de callos con BA en segmentos de hoja	26
Cuadro 3.	Clon Hgo 1, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA	27
Cuadro 4.	Clon Hgo 2, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA	28
Cuadro 5.	Clon Hgo 3, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA	29
Cuadro 6.	Clon Hgo 4, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA	31
Cuadro 7.	Clon Hgo 5, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA.	32
Cuadro 8.	Organogénesis indirecta: formación de brotes en clon Hgo 5.....	33

Cuadro 9. Clon Kew y su respuesta en la formación de brotes a partir de segmentos nodales en diferentes fotoperiodos.....	36
Cuadro 10. Clon Hgo 1 y su respuesta en la formación de brotes a partir de segmentos nodales en diferentes fotoperiodos.....	37
Cuadro 11. Clon cultivado de Kew y su respuesta al enraizamiento con floroglucinol.....	48
Cuadro 12. Clon Kew y su respuesta a la sacarosa en el enraizamiento	49
Cuadro 13. Clon Hgo 5 y su respuesta a la sacarosa en el enraizamiento.....	50
Cuadro 14. Clon Kew y su respuesta al fotoperiodo en el enraizamiento.....	52
Cuadro 15. Clon Hgo 5 y su respuesta a fotoperiodo en el enraizamiento	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Segmentos utilizados, a: Hoja, b: nudo.....	22
Figura 2. Escala de vigor; a: bajo, b: medio, c: alto	23
Figura 3. Callos formados con; a: 1 mg L ⁻¹ y b: 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D en clon Hgo 1	25
Figura 4. Segmentos de hoja en 2,4-D, sin formación de callo.....	25
Figura 5. Obtención de callos con BA, a: 0 mg L ⁻¹ b: 0.5 mg L ⁻¹ c:1 mg L ⁻¹ d: 2 mg L ⁻¹ e: 3 mgL ⁻¹	26
Figura 6. Brotes obtenidos del clon Hgo 1 con BA (mg L ⁻¹)	28
Figura 7. Brotes obtenidos del clon Hgo 2 con BA (mg L ⁻¹)	29

Figura 8. Brotes obtenidos del clon Hgo 3 con BA (mg L ⁻¹)	30
Figura 9. Brotes obtenidos del clon Hgo 4 con BA (mg L ⁻¹)	31
Figura 10. Brotes obtenidos del clon Hgo 5 con BA (mg L ⁻¹)	32
Figura 11. Hgo 5, formación de brotes a partir de callos con BA (mg L ⁻¹)	33
Figura 12. Respuesta de los 5 clones a BA en la variable brotes por nudo	34
Figura 13. Respuesta en la longitud de brotes de los 5 clones	34
Figura 14. Clon Kew, respuesta al número de brotes en segmentos nodales con diferentes fotoperiodos	36
Figura 15. Respuesta a la variable número de brotes a partir de segmentos nodales con diferentes fotoperiodos	37
Figura 16. Explantes usados para el enraizamiento.	45
Figura 17. Escala de vigor en los brotes evaluados; a: bajo, b: medio, c: alto..	47
Figura 18. Clon Kew, respuesta al número de raíces con floroglucinol	48
Figura 19. Clon kew, enraizamiento bajo diferentes concentraciones de sacarosa	49
Figura 20. Clon Hgo 5, enraizamiento bajo diferentes concentraciones de sacarosa	50
Figura 21. Enraizamiento bajo diferentes fotoperiodos	52

DEDICATORIA

Con especial dedicatoria a mis padres por haberme apoyado siempre

y animado en todo momento a seguir preparándome:

América Vázquez Jiménez y Rocelín Morales Ramírez

A mis hermanos por apoyarme siempre:

Mariola, Luceli, Abimael y Magali

A mis abuelos que siempre me han motivado a superarme:

Armando Morales y Amable Ramírez

Enrique Vázquez y Margarita Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitir el logro de este trabajo.

Al **CONACyT** por brindarme la beca que me permitió seguir estudiando.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por brindarme la oportunidad de concluir este grado académico.

Al **Dr. Juan Martínez Solís**, porque siempre estuvo al pendiente de mi trabajo y por todas las facilidades otorgadas para el buen desarrollo del trabajo.

A mi querido asesor y amigo **M. C. José Merced Mejía Muñoz** que siempre estuvo al pendiente de mi trabajo.

Al **M. C. Amando Espinosa Flores**, por la disposición y facilidades que me brindó.

A **Diana E. Gómez Pedraza**, por todo el apoyo durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y personal de laboratorio donde se llevaron actividades del trabajo, que de alguna manera me brindaron su apoyo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Bulmaro Morales Vázquez, nació en la localidad Viejo Monte Cristo de municipio de Las Margaritas del estado de Chiapas, México, el 28 de mayo de 1992. Con CURP MOV920528HCSRZL02. Es Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia por la Universidad Autónoma Chapingo, generación 2010-2015 con cédula profesional número 9338352. Los estudios de bachillerato los realizó en el estado de Chiapas en la preparatoria del estado “Lázaro Cárdenas de Río”. Realizó una estancia preprofesional en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, Chile. Ha participado en 2 congresos internacionales en el extranjero, el primero en el año 2015 en Gante, Bélgica y el más reciente en Bahía, Brasil en 2017, ha participado en congresos internacionales en México con temas en mejoramiento genético de ornamentales y cultivo de tejidos vegetales.

**VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN LA MULTIPLICACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO *In vitro* DE CLONES SILVESTRES DE COSMOS
CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.)**

RESUMEN GENERAL

En el año 2015 se colectó una población silvestre de cosmos chocolate. Con el propósito de estudiar la respuesta morfogénética *in vitro* en esta especie, se evaluaron cinco clones silvestres y uno cultivado. Se establecieron segmentos nodales y de hoja para la obtención de callos en dos clones; para organogénesis directa se colocaron segmentos nodales de los cinco clones silvestres. Se evaluó, en un clon cultivado y uno silvestre, la respuesta al fotoperiodo y su efecto en la multiplicación, además del efecto de la sacarosa y fotoperiodo en el enraizamiento. Asimismo, se valoró la respuesta al floroglucinol durante el enraizamiento en el clon cultivado. Los resultados muestran que la respuesta a la formación de callo con 2,4-D solo se observó en un 50 % en segmentos de hoja; con BA la mejor respuesta fue en segmentos nodales con un 100 % de formación de callo. En la etapa de organogénesis directa la respuesta a BA fue diferente para todos los clones, originando desde uno hasta 12.6 brotes. No se observó un efecto claro en los fotoperiodos probados. El floroglucinol duplicó el número de raíces por brote pasando de 11.1 a 24.2 raíces. La sacarosa disminuyó la longitud de raíces a medida que aumentó su concentración. Se concluye que todos los clones evaluados mostraron respuestas diferentes durante la morfogénesis *in vitro* y es necesario establecer protocolos específicos para su eficiente micropropagación.

Palabras clave: fotoperiodo, micropropagación, morfogénesis, organogénesis, sacarosa.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Director de Tesis: Juan Martínez Solís

MORPHOGENETIC VARIATION IN THE MULTIPLICATION AND ROOTING *In vitro* OF WILD CLONES OF CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.)

GENERAL ABSTRACT

In 2015, a wild population of chocolate cosmos was collected. In order to study the *in vitro* morphogenetic response in this species, five wild clones and a cultivated one were evaluated. Nodal and leaf segments were established to obtain callus in two clones. For direct organogenesis, nodal segments of the five wild clones were used. In a cultivated and a wild clone, the response to the photoperiod and its effect on multiplication, in addition to the effect of sucrose and photoperiod on rooting, were evaluated. The response to phloroglucinol during rooting in the cultivated clone was also assessed. The results show that the response to callus formation with 2,4-D was observed in only 50 % of leaf segments, while the best BA response was in nodal segments with 100 % callus formation. In the direct organogenesis stage, the effect of BA was different for all the clones, originating from one to 12.6 shoots. No clear effect was observed in the photoperiods tested. Phloroglucinol doubled the root number per shoot from 11.1 to 24.2. Root length decreased as sucrose concentration increased. It is concluded that all the clones evaluated showed different responses during *in vitro* morphogenesis and that it is necessary to establish specific protocols for their efficient micropropagation.

Key words: micropropagation, morphogenesis, organogenesis, photoperiod, sucrose.

Master's Thesis in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Advisor: Juan Martínez Solís

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.) es una especie endémica de México con gran valor ornamental por sus flores color guinda que desprenden un aroma a chocolate, sin embargo, presenta varios problemas para su mejoramiento y multiplicación (Fay & Hind, 2003). Esta especie es muy valorada como flor ornamental principalmente en países europeos, Japón y Estados Unidos de América, desafortunadamente en México es muy poca conocida y no se cuenta con ninguna variedad comercial. Un problema que presenta el clon resguardado en el jardín botánico de Kew, Inglaterra, es su autoincompatibilidad por lo que su propagación se realiza de forma asexual por división de raíces tuberosas o micropropagación (Fay & Hind, 2003).

Las últimas colectas de *C. atrosanguineus* resguardadas en herbarios fueron reportadas por Jerzy Rzedowski en octubre de 1986; Castro *et al.*, (2014), mencionan que han encontrado plantas en estado silvestre en años recientes. En agosto del 2015 en el estado de Hidalgo, México, investigadores de la Universidad Autónoma Chapingo colectaron material vegetal de una escasa población de plantas silvestres de Cosmos chocolate, el cuál fue llevado a la universidad e introducido en cultivo *in vitro* para su micropropagación y conservación. Existen algunos trabajos reportados acerca de la micropropagación y conservación de esta especie en cultivo *in vitro*, uno de los primeros fue realizado por Hosoki *et al.* (2003), logrando su micropropagación con secciones de tallos con nudos y el uso de benciladenina (BA) en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), además logró un 60 % de enraizamiento de explantes con ácido indolbutírico (AIB). Ortega *et al.* (1997), desarrollaron protocolos con el fin de reintroducir la especie a su medio natural, mientras que Oku *et al.* (2008) realizaron un experimento para la regeneración de *C. atrosanguineus* y promover brotes adventicios en callos; más tarde Wilkinson *et al.* (2003), realizaron trabajos de crio-preservación y obtuvo brotes de callos en medio MS adicionando 0.5 mg L⁻¹ de BA y 0.01 mg L⁻¹ de (ANA). Lorenzo (2006),

realizó trabajos de micropropagación y enraizamiento de explantes de cosmos chocolate y uno de los trabajos más recientes fue realizado por Gómez y Morales en 2015 con un protocolo eficiente de enraizamiento donde con 0.8 mg L⁻¹ de ANA y 1 mg L⁻¹ de AIB obtuvieron el 100 % de plantas enraizadas y aclimatadas. Todos estos trabajos han sido realizados con el clon cultivado de Kew, sin embargo, para material silvestre que presenta diferentes respuestas morfogénicas en cultivo *in vitro* como los materiales recientemente colectados, no se tienen protocolos descritos, ni se ha reportado trabajos con material silvestre de esta especie, es por eso que este trabajo tiene como objetivo estudiar la respuesta morfogénica en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de clones silvestres de cosmos chocolate, para desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación en materiales silvestres que permitan su conservación y eficiente multiplicación *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo eficiente para la multiplicación y enraizamiento de clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer las concentraciones de BA para la obtención de brotes a partir de segmentos nodales en la etapa de multiplicación *in vitro* de clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

Determinar el efecto del fotoperiodo en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

Determinar el efecto de la sacarosa en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Cosmos atrosanguineus*

Determinar el efecto del floriglucinol en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Cosmos atrosanguineus*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El género *Cosmos* y su importancia en la floricultura

México es un país megadiverso, dentro del cual se albergan muchas especies vegetales endémicas y que tienen alguna importancia agronómica, ya sea alimenticia, medicinal u ornamental. Nuestro país cuenta con una gran riqueza florística, alrededor de 30 000 especies, concentrándose en el sur del país, junto con el norte de Centroamérica, uno de los centros mundiales de origen y diversidad de plantas cultivadas (Ortega, 1991), sin embargo, uno de los problemas a los que se enfrentan nuestros recursos fitogenéticos son la sobreexplotación de los recursos forestales y modificación de sus hábitats en los que se desarrollan lo que ha propiciado que algunas especies se encuentren en peligro de extinción o estén extintas de su medio natural y solamente se encuentren en jardines botánicos.

El género *Cosmos* Cav., perteneciente a la tribu *Coreopsideae* (Less.) de la familia de las Asteráceas es ejemplo de la amplia diversidad y endemismo en el país, siendo junto con los géneros *Bidens*, *Coreocarpus* y *Thelesperma*, uno de los grupos monofiléticos más diversos (Crawford *et al.*, 2009). Este género se distribuye en el Norte, Centro y Sudamérica; con 36 especies (Melchert, 1968). Hábitat: bosque mixto seco y rocoso de pino-encino; con altitudes desde 2 hasta 3,300 msnm.

Estudios más recientes mencionan que el género *Cosmos* está formado por 35 especies y 4 variedades. Distribuyéndose desde el suroeste de Estados Unidos de América hasta el norte de Argentina, en México se pueden encontrar 33 de las especies y las 4 variedades (Vargas *et al.*, 2013). El género se divide en 3 secciones: 1) *Cosmos* sección *Cosmos* Sherff; 2) *Cosmos* sección *Mesinenia* Sherff y 3) *Cosmos* sección *Discopoda* (DC.) Sherff. (Sherff, 1932)

Cosmos sección *Cosmos* agrupa 5 especies anuales con cabezuelas de 8 flores liguladas de color blanco, violeta o anaranjado y aquenios pubescentes de cuerpo

alargado. *Cosmos* sección Mesinenia incluye 8 especies sufruticosas que producen cabezuelas con 5-8 flores liguladas de color blanco, violeta o amarillo y aquenios pubescentes o glabros de cuerpo corto. Por último, *Cosmos* sección Discopoda está representada por 22 especies de hábitos herbáceos, perennes, con raíces tuberosas, cabezuelas con 8-10 flores liguladas, blancas, violáceas o púrpuras y aquenios pubescentes o glabros de cuerpo exiguo (Sherff, 1932; Vargas *et al.*, 2013). Son pocas las especies del género *Cosmos* que están en cultivo alrededor del mundo: *C. atrosanguineus* Sherff (cosmos negro, cosmos chocolate), *C. bipinnatus* Cav. (Cosmos comunes, cosmos mexicanos), *C. sulphureus* Cav. (Cosmos amarillo o naranja) (Crawford *et al.*, 2009).

2.2 Propiedades nutraceuticas de algunas especies del género *Cosmos*

Se reporta que los mexicanos llamaban “Xochipatlí” (Planta florida) a *Cosmos sulphureus* y era utilizada como antinarcótico (Sánchez e Islas, 1997).

Fuzzati *et al.* (1995), realizaron trabajos sobre fenilpropano derivados de raíces de *Cosmos caudatus*, las sustancias encontradas fueron hydroxyeugenol y cinco derivados de alcohol coniferílico que poseen propiedades antifúngicas.

Mohamed *et al.* (2012), realizaron estudios en ratas para determinar el efecto de extracto acuoso de *Cosmos caudatus*, sobre el potencial como agente terapéutico para restaurar daños óseos en mujeres posmenopáusicas debido a que esta planta posee antioxidantes y minerales.

Olajuyigbe y Ashafa (2014), extrajeron de hojas de *Cosmos bipinnatus* aceites esenciales donde encontraron que predominantemente se componen de monoterpenos (69.62 %) y sesquiterpenos (22.73 %). En un ensayo con bacterias demostraron que el aceite tenía efectos inhibitorios significativos contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, con lo que podría ser utilizado para tratar infecciones en humanos causadas por bacterias.

En Malasia y la India la especie *Cosmos caudatus* Kunth, conocida comúnmente como Ulam Raja (“Ensalada del Rey”), es una de las hierbas medicinales más

populares utilizadas para el tratamiento de enfermedades humanas. Posee un olor atractivo y singular aroma y sabor que añaden diversidad a la alimentación, normalmente es consumida de forma cruda. También utilizada como saborizante de alimentos y aditivo en mezclas de medicina tradicional. Además, algunos estudios nutraceuticos han demostrado que *Cosmos caudatus* es una rica fuente de compuestos bioactivos incluyendo flavonoides, carbohidratos, compuestos fenólicos, minerales, proteínas y vitaminas que aumentan su valor nutricional (Bunawan *et al.*, 2014).

2.3 *Cosmos atrosanguineus*, especie y descripción

Cosmos atrosanguineus es una especie ornamental dentro del género *Cosmos*, que es endémica de México y su principal atractivo es el aroma a chocolate que desprende de sus flores, además del color guinda de la flor (Fay & Hind, 2003). Sherff (1932), colocó a *C. atrosanguineus* en una nueva sección, *Cosmos* sección *Discopoda* (DC.) Sherff, teniéndolo que transferir de la sección *Candolle* de *Bidens* L. a *Cosmos*. La sección esencialmente contiene las especies perennes con raíces tuberosas y la mayoría tiene corolas violetas a marrón rojizo oscuro (Sherff, 1932).

Sherff (1932), localizó el origen de la especie en el Este-Centro de México, desde San Luis Potosí hacia el Sureste de Hidalgo, sugiriendo a Zimapán, Hidalgo. El hábitat donde se podría encontrar *C. atrosanguineus* es en bosque de pino y encino, hábitat donde se encuentran muchas otras especies del género (Fay & Hind, 2003). Sin embargo, muestras del Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG) sitúan colectas de esta especie en los estados de San Luis Potosí e Hidalgo. Por otro lado, Castro *et al.* (2014), agregan que en los estados de Querétaro y Guanajuato también se distribuía esta especie.

C. atrosanguineus presenta raíces tuberosas relativamente pequeñas de 3 cm de largo por 1.5-3 cm de diámetro, por lo general se estrecha por debajo de la raíz pivotante napiforme. Los tallos son relativamente pocos, ascendiendo algo curvos y probablemente decumbentes, generalmente retorcidos, más o menos

hispidos con pelos pluricelulares uniseriados en la parte baja de los tallos, pero glabras por encima de la mayoría. Generalmente la inflorescencia se constituye de ocho flores liguladas, uniseriadas, finalmente deciduas hacia la columna central de las flores del disco (Fay & Hind, 2003).

Casi 40 discos florales, hermafrodita, presumiblemente fértil en material original silvestre pero estéril en todo el material cultivado, tubo de la corola de 2 mm de largo, verde, porción baja glabra luego moderadamente pubescente con pelos pluricelulares uniseriados glandulares por encima, el cuello de la corola de 4-4.5 mm de largo, gradualmente extendiéndose a la base de los lóbulos de 0.8-1.5 mm de diámetro, verdoso en la base pasando abruptamente a través de un color rosa a un marrón-rojizo oscuro en la mitad superior, Aquenios inmaduros e infértiles=estériles en material cultivado, de 13-20 mm de largo. Polen abundante de color Amarillo, especie autoincompatible (Fay & Hind, 2003)

2.4 Situación actual de *Cosmos atrosanguineus* y su uso comercial

Rodríguez *et al.* (2006), señalan que no se han encontrado a *C. atrosanguineus* en estado silvestre, al igual que Oku *et al.* (2008) mencionan que esta especie está extinta en la naturaleza, colocándolo en el rango de “especies amenazadas de primera prioridad”. La última colecta reportada fue en octubre de 1986 por Jerzy Rzedowski (Castro, Vargas, Harker, & Rodríguez, 2014).

C. atrosanguineus y *C. diversifolius* son especies perennes cultivadas, pero no tan comunes. En México, el uso ornamental, bajo cultivo de cosmos no es tan común como en otros países donde es costumbre sembrar plantas ornamentales anuales cada año (Rodríguez *et al.* 2006), incluso cosmos chocolate suele ser desconocida en México, sin embargo, es una planta comercializada en varios países del mundo, entre ellos destacan, Japón, Nueva Zelanda, EE.UU., Inglaterra y países de la Unión Europea, se ofrece en presentaciones principalmente como flor de maceta, aunque también como flor para jardín y flor de corte. Los precios en los mercados van desde 5 hasta 17 libras esterlinas en

Inglaterra y de 3 hasta 19 euros en países de la Unión Europea (Harven, 2015), en EE. UU., se comercializa con costos alrededor de los 7 dólares (Daves, 2015).

De acuerdo a la INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS (UPOV) se tienen registradas variedades nuevas de *C. atrosanguineus*, obtenidas principalmente por hibridaciones, estas se encuentran patentadas en diferentes países, los nombres de las variedades son: Pinot Noir, Coco Chanel, HAMSCOP, HAMCOEC, STRAWBERRY CHOCO SANSE 41, CACAO CHOCO SANSE 35, 3013/01, New choco y THOMOCHA. (UPOV, 2015). Oku *et al.* (2008), desarrollaron satisfactoriamente un híbrido entre *C. atrosanguineus* x *C. sulphureus*, usando rescate de embriones. El resultado de esta hibridación produjo una planta híbrida con un fenotipo intermedio para el color de flores, el cual fue rojo carmesí, además de que presentó raíces tuberosas como *C. atrosanguineus*, otra característica interesante fue la fuerte tolerancia a calor y a la enfermedad del moho gris.

2.5 Estudios de la micropropagación de *Cosmos atrosanguineus*

Debido a que el clon cultivado con el que se cuenta de esta especie es autoincompatible, hace que su propagación sea exclusivamente por la vía asexual lo que ha dificultado en gran parte su mejoramiento genético (Fay & Hind, 2003). La división de camotes y micropropagación son las vías por las cuales se propagan para la venta comercial de estas especies. Sin embargo, la propagación por división de camotes es más lenta y no está libre de problemas fitosanitarios, es debido a esto que la micropropagación es una mejor opción en tiempo y cantidad de plantas obtenidas. Este proceso se lleva generalmente en 4 etapas; introducción del material vegetal, multiplicación del material vegetal, enraizamiento de explantes y aclimatación de plantas enraizadas (Murashige, 1974).

Se han realizado algunos trabajos en esta especie relacionados con su propagación *in vitro*, uno de los primeros trabajos en México fue realizados por Ortega *et al.* (1997) en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el fin de reintroducir la especie a su medio natural. Anteriormente se habían desarrollado protocolos por parte del Jardín Botánico de Kew a petición de la UNAM durante el año de 1990.

Hosoki *et al.* (1993) mencionan que la micropropagación de cosmos chocolate se logró mediante subcultivo de secciones de tallo con nudos o la división de brotes axilares en medio base MS (Murashige & Skoog, 1962) con benciladenina (BA). La tasa de multiplicación óptima fue de 3.7 brotes por un periodo de cultivo de 17 días y se logró sin la vitrificación en medio que contenía 0.2 mg L⁻¹ de BA. Los brotes alargados de microesquejes enraizados de cultivo *in vitro* (60 %) en medio con 1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB). La mayoría de las plántulas (93 %) fueron aclimatadas *ex vitro*. La tasa más alta de regeneración (80 %) y el número de brotes (5.3) por sección de entrenudos se obtuvo en el medio con solo 1 mg L⁻¹ de BA, al suplementarlo con 0.3 mg L⁻¹ de ANA se suprimió por completo la regeneración de brotes independientemente de la concentración de BA. Cervantes *et al.* (1999) para el enraizamiento usaron MS 50 % líquido, con AIB 1 mg·L⁻¹.

Oku *et al.* (2009), realizaron un experimento para la regeneración de *C. atrosanguineus* a través del cultivo de protoplastos teniendo el mejor resultado con MS al 50% con sorbitol (0.3 M). Y para promover brotes adventicios en callos friables el mejor tratamiento fue con 2,4-D 0.1 mg·L⁻¹. Más tarde Wilkinson *et al.* (2003) realizaron trabajos de crio-preservación en esta especie y mencionan que *Cosmos atrosanguineus* respondía bien al cultivo *in vitro* ya que obtuvo brotes de callos en medio MS adicionando 0.5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 0.01 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA).

2.6 El papel de los fitorreguladores en el cultivo de tejidos

2.6.1 Citocininas

Skoog *et al.* (1951), demostraron que el tipo de diferenciación que se produzca en un meristemo dependerá de la proporción entre auxinas y citocininas u otras

sustancias, como la adenina, que estimula la división celular, las citocininas estimulan el desarrollo de brotes y se oponen al enraizamiento. Es por eso que un balance en la concentración de Citocininas y Auxinas es determinante para la morfogénesis de muchos tejidos, esto se conoce como “la ley de Skoog y Miller” (Skoog y Miller, 1957)

Las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina (Skoog y Miller, 1957), y se evitan o se emplean a dosis muy débiles en los medios de enraizamiento, ya que en concentraciones elevadas ($1-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) generalmente inhibe la formación de raíces ó ejercen generalmente un efecto inhibitor sobre la rizogénesis (Pierik, 1990; Margara, 1988). La citocininas que se usan con mayor frecuencia son: la Cinetina (KIN), la benciladenina (BA), 6-benzyl-9-tetrahidropirano adenina ‘SD 8339’ (PBA), la 2-isopentiladenina (2 iP) y la zeatina.

2.6.2 Auxinas

Las auxinas estimulan la división celular y son las encargadas de promover la formación de raíces, fomentando el desarrollo de callos, lo que deriva en crecimientos similares a raíces, siendo muy efectivas en iniciar la formación de raíces (Thimann y Went 1934). Las auxinas generalmente ejercen el control primario en la formación de raíces. De los reguladores del crecimiento, el que comúnmente se utiliza para enraizar es el ácido indolbutírico (AIB), el cual es uno de los mejores estimuladores del enraizamiento. El AIB es un fitorregulador degradado lentamente por los sistemas de enzimas destructores de auxinas. Usado con frecuencia como un producto químico persistente que resulta muy eficaz como estimulante de las raíces. Debido a que el AIB se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación (Thimann y Went 1934).

Los reguladores del crecimiento que se desplazan con facilidad pueden causar efectos indeseables de crecimiento en la planta propagada, otra auxina excelente que es utilizada con frecuencia en la promoción de raíces es el ácido 1-

naftalenacético (ANA), sin embargo, este compuesto es más tóxico que el AIB y deben evitarse las concentraciones excesivas de ANA por el peligro de provocar daños a las plantas. El AIB y el ANA resultan más efectivos en la inducción del enraizamiento que el ácido indolacético (AIA). El AIA es muy inestable en las plantas y se descompone rápidamente en soluciones no esterilizadas aun cuando permanece activo en soluciones estériles durante varios meses. Los rayos fuertes del sol pueden destruir en 15 minutos una solución de 10 ppm de AIA (Weaver, 1976).

Las amidas de AIB y ANA son también agentes muy efectivos del enraizamiento. La forma amida de ANA es menos tóxica que el ANA y, por tanto, puede utilizarse con mayor seguridad, otros homólogos son agentes eficaces de enraizamiento, aunque ninguno de ellos sea superior al ANA. Muchos compuestos de fenoxi promueven la formación de raíces cuando se emplean en bajas concentraciones. Al aplicarlos en concentraciones muy elevadas tienden a producir raíces gruesas y atrofiadas y su límite de toxicidad se aproxima a la concentración óptima para la iniciación de raíces. El 2,4-D promueve el enraizamiento en ciertas especies; no obstante, puesto que es potente y se desplaza con facilidad, por lo común tiende a inhibir el desarrollo de los brotes y a originar daños en ellos, sobre todo cuando se utiliza mucho del producto químico (Weaver, 1976).

Los reguladores del crecimiento pueden modificar tanto el tipo de raíces como el número en que se produzcan, el AIB produce un sistema de raíces fuertes y fibrosas, mientras que los ácidos fenoxiacéticos a menudo producen un sistema de raíces atrofiado y matoso compuesto de raíces dobladas y gruesas. Las sustancias promotoras del enraizamiento son a menudo más eficaces cuando se utilizan en combinación, partes iguales de AIB y ANA provocan que un porcentaje más alto de estacas produzcan raíces en algunas especies, que cualquiera de ambos utilizado por separado (Hitchcock & Zimmerman, 1940).

A las auxinas se les atribuye la causa de expansión celular, una de las teorías que explica parcialmente la expansión celular, es la que hace referencia al aumento de la plasticidad de las paredes celulares, lo que disminuye la presión

alrededor de la célula y la presión de turgencia debida a fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, haciendo que el agua entre a las células, provocando la expansión. Son dos las etapas por las cuales ocurre el aumento del tamaño de la célula, en la primera ocurre un aflojamiento de las paredes celulares (en la cual se requiere la presencia de auxinas y oxígeno), y en la segunda la absorción de agua y la expansión de las paredes (Weaver, 1976).

2.6.3 Cofactores en el enraizamiento

El buen enraizamiento depende de la presencia en las estacas de cierto número de cofactores que en combinación con las auxinas permite que las estacas generen raíces; la fuente de estos cofactores es por lo común las hojas. La pérdida de hojas reduce considerablemente las probabilidades de enraizamiento. Los materiales nitrogenados y azúcares producidos en las hojas son quizá cofactores del enraizamiento. Sin embargo, el suministro de azúcares y compuestos nitrogenados, pueden reemplazar por completo los efectos promotores de las hojas en la iniciación de las raíces. También hay pruebas de que ciertos compuestos fenólicos, como son el cafeico, el catecol y el ácido clorogénico, interactúan con las auxinas al inducir la iniciación de las raíces (Weaver, 1976).

Los tejidos en cultivo *in vitro* son ampliamente heterotróficos con respecto al carbono, debido a la ausencia de fotosíntesis o asimilación de clorofílica, por ello es indispensable añadir glúcidos a los medios de cultivo (Margara, 1988). Según Merino (1987), la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente empleada y es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Generalmente se utiliza una concentración de 1-5 % de sacarosa (Pierik, 1990), Takeuchi, (1973) por el contrario lo reduce a 2-5 % y de acuerdo con Hurtado y Merino, (1987) va de 2 a 3 %. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos, la sacarosa actúa como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. (Ertola *et al.*, 1994).

Pierik (1990) menciona que el compuesto fenólico floroglucinol, inhibe a la IAA-oxidasa (responsable de la degradación del IAA). Hammat (1994), al utilizar floroglucinol más auxinas en brotes de cerezo observó mayor enraizamiento. Hunter (2015) menciona que el floroglucinol puede inducir la formación de vástagos axilares, y que, aplicado junto con auxinas, actúa de forma sinérgica, induciendo la formación de raíces adventicias, Jankiewicz (1989) menciona como sinergistas de auxinas y Jankiewicz *et al.* (2003), mencionan que, para estimular el enraizamiento en cultivo de tejidos, se usa el floroglucinol.

2.7 Fotoperiodo

Existen pocos estudios documentados acerca de la respuesta al fotoperiodo en esta especie, uno de los estudios reportados menciona que, en términos de la respuesta global al fotoperiodo, la floración se adelanta por días largos; las plantas con una duración de 17 h por día florecieron 33 días antes que aquellas a las 8 h por día (Kanellos & Pearson, 2000). El fotoperiodo también afectó drásticamente la morfología de la planta, con fotoperiodos largos (17 h por día) que conducen a un aumento de más de 7 veces en la masa de la planta en comparación con los días cortos (8 h por día) (Kanellos & Pearson, 2000). Con esto se demuestra que esta especie podría ser manejada mediante fotoperiodo para fines hortícolas aprovechándola como flor de maceta con fotoperiodo de 8 horas y como flor de corte con fotoperiodo de 17 horas (Kanellos & Pearson, 2000).

2.8 Literatura citada

- Bunawan, H., Nataqain Baharum, S., Noraini Bunawan, S., Mat Amin, N., & Mohd Noor, N. (2014). *Cosmos Caudatus* Kunth: A Traditional Medicinal Herb. *Global Journal of Pharmacology*, 8(3), 420-426.
- Castro, A., Vargas, G., Harker, M., & Rodríguez, A. (2014). Análisis macromorfológico y citogenético del género *Cosmos* (Asteraceae, Coreopsidae), con una clave para su identificación. *Botanical Sciences*, 363-388.
- Cervantes, V., Olguín, P., Ortega P., López A. L., V. Chávez A., Y Bye R. 1999. Micropropagación y establecimiento *ex vitro* de *Cosmos atosanguineus* (Hook.) A. Voss, especie extinta en la naturaleza. Tercer encuentro sobre el conocimiento de las dalias en México. *Amaranto*, 10:1-9.
- Crawford, D. J., Tadesse, M., Mort, M. E., Kimball, R. T., & Randle, C. P. (2009). Coreopsidae. En V. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy, & R. J. Bayer (Edits.), *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae* (págs. 713-730). Viena: International Association for Plant Taxonomy.
- Daves, G. (2015). *Chocolate cosmos (Cosmos atosanguineus)*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de <http://davesgarden.com>.
- Ertola, R.J., A.M. Giulietti and F.J. Castillo. (1994). Design, formulation and optimization of media. In: *Bioreactors Systems Design*. Asenjo J. and J Merchuk (eds.). Marcel Dekker. New York. USA. pp.: 89-137.
- Fay, M. F., & Hind, N. (2003). *Cosmos atosanguineus* Compositae. *Curtis's Botanical Magazine*, 20(1), 40-48.
- Fuzzati, N., Wahjo Dyatmiko, S., Rahman, A., & Hostettmann, K. (1995). Phenylpropane derivatives from roots of *Cosmos caudatus*. *Phytochemistry*, 39(2), 409-412.

- Gómez, P. D., y Morales V. B. (2015). Inducción *In vitro* de raíces tuberosas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo 71: 40-61.
- Hammatt, N. (1994). Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regul*, 14:127-132
- Harven, S. (2015). *Chocolate cosmos (Cosmos atrosanguineus), flowers*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de <https://www.sarahraven.com>.
- 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.
- Hitchcock, A., & Zimmerman, P. (1940). Effects obtained with mixtures of root-inducing and other substances. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 11, 143-160.
- Hunter, C. S. (2015) *In Vitro Culture of Cinchona Ledgeriana* L., *Journal of Horticultural Science*, 54:2, 111-114.
- Hurtado, M. D. V; Merino, M. M. E. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México, D. F. 232 p.
- Jankiewicz S., L. (1989). Desarrollo Vegetal; sustancias reguladoras. UACH. 82-83 p.
- Jankiewicz S., L. (2003). Reguladores del Crecimiento Desarrollo y Resistencia en Plantas. Propiedades y acción. Volumen1. Ed. Mundi-Prensa. México, D.F., Madrid, Barcelona. 487 p

- Kanellos, E., & Pearson, S. (2000). Environmental regulation of flowering and growth of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Scientia Horticulturae*, 265-274.
- Lorenzo, I. A. (2006). Enraizamiento *in vitro* y desarrollo *in vivo* de cosmos (*cosmos atrosanguineus* Sherff.). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, 53: 29-45.
- Margara, J. (1988). Multiplicación Vegetativa y Cultivo in Vitro. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, 237 p.
- Melchert, T. (1968). Systematic studies in the Coreopsidinae: cytotaxonomy of Mexican and Guatemalan *Cosmos*. *American Journal of Botany*(55), 345-353.
- Mohamed, N., Gwee Sian Khee, S., Shuid, A., Muhammad, N., Suhaimi, F., Othman, F., & Soelaiman, I. (2012). The effects of *Cosmos caudatus* on structural bone histomorphometry in ovariectomized rats. *BMC Research Notes*, vol. 6, 1-6.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.
- Olajuyigbe, O., & Ashafa, A. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Cosmos bipinnatus* Cav leaves from South Africa. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(4), 1417-1423.
- 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. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 323-327.

- Ortega, P. E. (1991). Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México. *SOMEFI*, 449: 417-437
- Ortega-Larrocea, M., Chávez, M., & Bye Boettler, R. (1997). Micropropagación y establecimiento ex vitro de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranto*, 10, 1-9.
- Pierik R. L. M. (1990). Cultivo in vitro de la Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Rodriguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del Género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 610-619.
- Sánchez, J., & Islas, V. (1997). *La evolución de la farmacia en México*. Universidad Nacional Autónoma de México, 73: 10-29.
- Sherff, E. E. (1932). *Revision of the Genus Cosmos* (Vol. 8). Chicago, U.S.A.: Field Museum Publications in Botany. *Botanical Series* 8:401-447.
- Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131.
- Takeuchi M. (1973). Metodo de Cultivo de Tejidos Vegetales. Colegio de Posgraduados. ENA. México, Edo. 253 p.
- Thimann, K., & Went, F. (1934). On the chemical nature of the root-forming hormone. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 37, 456-459.
- UPOV. (2015). *International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de Database Plant Variety: <http://www.upov.int>

- Vargas, G., Castro, A., Harker, M., Villaseñor, J., Ortiz, E., & Rodríguez, A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (Asteraceae: Coreopsideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*(84), 536-555.
- Weaver, R. (1976). *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. México: Trillas, 622: 500-550.
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann Bot.*, 91(1), 65-74.

3. VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN CLONES SILVESTRES DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) DURANTE SU MICROPROPAGACIÓN: ETAPA II MULTIPLICACIÓN

3.1 Resumen

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) es una especie ornamental endémica de México. En el año 2015 se colectó una escasa población silvestre de cosmos chocolate. Con el propósito de estudiar la respuesta morfogénética *in vitro*, en la etapa de multiplicación, se evaluaron seis clones, uno cultivado y 5 silvestres. Se establecieron segmentos nodales y de hoja para la obtención de callos en 2 clones; se evaluó la respuesta al fotoperiodo y su efecto en la multiplicación en el clon cultivado y uno silvestre. Los resultados muestran que la respuesta a la formación de callo con 2,4-D solo se observó en un 50 % en segmentos de hoja y 0% en segmentos nodales; en tratamientos con BA se obtuvo un 66.7 % de formación de callo a partir de segmentos de hoja y un 100 % con segmentos nodales. En la etapa de organogénesis directa la respuesta a BA fue diferente para todos los clones, originando desde uno hasta 12.6 brotes por segmento nodal. No se observó un efecto claro en los fotoperiodos probados. Por lo que se concluye que cada clon tiene respuestas morfogénéticas diferentes y es necesario seguir protocolos específicos para cada uno en su micropropagación.

Palabras clave: clon, callos, fotoperiodo, *in vitro*, organogénesis.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Director de Tesis: Juan Martínez Solís

3.2 Abstract

MORPHOGENETIC VARIATION IN WILD CLONES OF CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.) DURING ITS PROPAGATION: STAGE II MULTIPLICATION

Abstract

The chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) is an ornamental species endemic from Mexico. In 2015, a wild population of chocolate cosmos was collected. In order to study the *in vitro* morphogenetic response in this species, five wild clones and a cultivated one were evaluated. Nodal and leaf segments were established to obtain callus in two clones. In a cultivated and a wild clone, the response to the photoperiod and its effect on multiplication were evaluated. The results show that the response to callus formation with 2,4-D was observed in only 50 % of leaf segments, while the best BA response was in nodal segments with 100 % callus formation and 66.7 % in leaf segments. In the direct organogenesis stage, the effect of BA was different for all the clones, originating from one to 12.6 shoots. No clear effect was observed in the photoperiods tested. It is concluded that all the clones evaluated showed different responses during *in vitro* morphogenesis and that it is necessary to establish specific protocols for their efficient micropropagation.

Key words: clone, callus, *in vitro*, organogenesis, photoperiod.

Master's Thesis in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Advisor: Juan Martínez Solís

3.3 Introducción

Cosmos atrosanguineus es una especie ornamental dentro del género *Cosmos*, que es endémica de México y su principal atractivo es el aroma a chocolate que desprende de sus flores, además del color guinda de la flor (Fay & Hind, 2003). En México, el uso ornamental, bajo cultivo, de cosmos no es tan común como en otros países donde es costumbre sembrar plantas ornamentales anuales cada año (Rodríguez *et al.*, 2006), incluso cosmos chocolate suele ser desconocida en México, sin embargo, es una planta comercializada en varios países del mundo, entre ellos destacan, Japón, Nueva Zelanda, EE.UU., Inglaterra y países de la Unión Europea, se ofrece en presentaciones principalmente como flor de maceta, aunque también como flor para jardín y flor de corte.

Los precios en los mercados van desde 5 hasta 17 libras esterlinas en Inglaterra y de 3 hasta 19 euros en países de la Unión Europea (Harven, 2015), en EE. UU., se comercializa con costos alrededor de los 7 dólares (Daves, 2015). De acuerdo al catálogo de INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS (UPOV) se tienen registradas variedades nuevas de *C. atrosanguineus*, obtenidas principalmente por hibridaciones, estas se encuentran patentadas en diferentes países, los nombres de las variedades son: Pinot Noir, Coco Chanel, HAMSCOP, HAMCOEC, STRAWBERRY CHOCO SANSE 41, CACAO CHOCO SANSE 35, 3013/01, New choco y THOMOCHA (UPOV, 2015). Oku *et al.* (2008), desarrollaron satisfactoriamente un híbrido entre *C. atrosanguineus* x *C. sulphureus*, usando rescate de embriones.

El clon cultivado con el que se cuenta de esta especie es autoincompatible, esto limita su propagación sea por la vía asexual lo que ha dificultado en gran parte su mejoramiento genético (Fay & Hind, 2003). La división de camotes y micropropagación son las vías por las cuales se propagan para la venta comercial de estas especies, la micropropagación es la vía más rápida, este proceso se lleva generalmente en 4 etapas; introducción del material vegetal, multiplicación del material vegetal, enraizamiento de explantes y aclimatación de plantas enraizadas (Murashige, 1974).

Existen algunos trabajos reportados acerca de la micropropagación y conservación de esta especie en cultivo *in vitro*, uno de los primeros fue realizado por Hosoki *et al.* (1993) logrando su micropropagación con secciones de tallos con nudos y el uso de benciladenina (BA) en medio MS (Murashige & Skoog, 1962). Ortega *et al.* (1997) desarrollaron protocolos con el fin de reintroducir la especie a su medio natural, mientras que Oku *et al.* (2008) realizaron un experimento para la regeneración de *C. atrosanguineus* para promover brotes adventicios en callos; más tarde Wilkinson *et al.* (2003) realizaron trabajos de crio-preservación y obtuvo brotes de callos en medio MS adicionando 0.5 mg L⁻¹ de BA y 0.01 mg L⁻¹ de (ANA). Lorenzo (2006) realizó trabajos de micropropagación y enraizamiento de explantes de cosmos chocolate. Todos estos trabajos han sido realizados con el clon cultivado de Kew, sin embargo, para material silvestre que presenta diferentes respuestas morfogénicas en cultivo *in vitro* como los materiales recientemente colectados por investigadores de la Universidad Autónoma Chapingo en el año 2015, no se tienen protocolos descritos, ni se ha reportado trabajos con material silvestre de esta especie, es por eso que este trabajo tiene como objetivo estudiar la respuesta morfogénica *in vitro* en la etapa de multiplicación, para desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación en materiales silvestres que permitan su conservación y eficiente multiplicación *in vitro*.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Ubicación de los experimentos y material vegetal utilizado

El material vegetal utilizado fue colectado de plantas de *C. atrosanguineus* que se encontraban en estado silvestre en un sitio ubicado en la sierra de Zimapán del estado de Hidalgo, México. Segmentos nodales de plantas adultas se introdujeron a cultivo *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Autónoma Chapingo a un fotoperiodo de 16 horas luz, 25 °C y una intensidad lumínica de 70 μMm⁻²s⁻¹. Los segmentos nodales se mantuvieron en medio de multiplicación hasta obtener brotes de al menos 2 cm de longitud, el medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado con 120

mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina (Lorenzo, 2006) y adicionando 0.2 mg L⁻¹ de ácido naftalenácetico (ANA) y 2 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) (Gómez y Morales, 2015). Al final se lograron mantener 5 clones nombrados Hgo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, más un clon cultivado que se tenía proveniente del jardín botánico de Kew, Inglaterra al que se le denominó Kew.

3.4.2 Organogénesis indirecta

Para la organogénesis indirecta se colocaron segmentos de hoja de 0.5 cm² y segmentos nodales de 0.5 cm de longitud a los que se les eliminó las hojas desde la base (Figura 1), utilizando el clon Hgo 1 y 5, colocados en medio MS, modificado con 120 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina, el fitorregulador usado fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹ más un control de 0 mg L⁻¹.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los tratamientos de 2,4-D, se prosiguió a realizar un experimento más, donde se usó el mismo medio de cultivo y solamente se cambió el 2,4-D por diferentes concentraciones de BA más una concentración constante de 0.2 mg L⁻¹ de ANA, únicamente se usó explantes de segmentos de hoja de 0.5 cm². Las concentraciones de BA fueron 0.5, 1, 2 y 3 mg L⁻¹, más un control de 0 mg L⁻¹. Después de 30 días se evaluó el porcentaje de formación de callo.



Figura 1. Segmentos utilizados, a: Hoja, b: nudo.

3.4.3 Organogénesis directa

Para observar la respuesta de cada clon silvestre, se utilizaron segmentos nodales de 0.5 cm de longitud, con un par de yemas axilares los cuales se les eliminó las hojas desde su base (Figura 1, b) y posteriormente fueron colocados en un medio de cultivo MS modificado con 120 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina más diferentes concentraciones de BA; 0.5, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de BA, adicionalmente se colocó un control con 0 mg L⁻¹ de BA. En todos los tratamientos se adicionó 0.2 mg L⁻¹ de ANA. Después de 30 días se evaluó el número de brotes por nudo, longitud y número de nudos de los 2 brotes más largos, porcentaje de nudos que brotaron, cualitativamente se evaluó el vigor (alto, medio y bajo) (Figura 2). En los explantes que formaron callo se evaluó porcentaje de nudos que formaron callo y peso de callo.

Adicionalmente del clon Hgo 5, con los callos obtenidos, se les eliminó los tallos y los callos fueron colocados en nuevo medio de cultivo con las mismas concentraciones de BA para evaluar si originaban brotes, por lo que después de 30 días se evaluó el número de brotes por callo, longitud y número de nudos de los 2 brotes más largos, peso del callo y cualitativamente se evaluó el vigor.

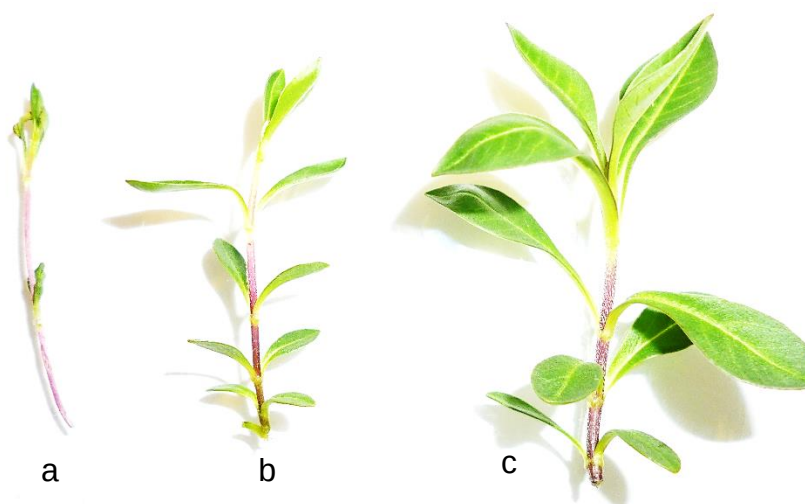


Figura 2. Escala de vigor; a: bajo, b: medio, c: alto

3.4.4 Respuesta al fotoperiodo en la obtención de brotes

Para esta etapa se utilizó uno de los clones silvestres el Hgo 1 que presentaba gran cantidad de brotes por segmento nodal. Se colocó en un medio MS modificado con 120 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina, 1 mg L⁻¹ de BA y 0.2 mg L⁻¹ de ANA. Se establecieron 5 tratamientos; 8, 10, 12, 14 y 16 horas luz a una intensidad lumínica de 70 $\mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$, donde el control fue de 16 horas luz (condición normal del laboratorio). Las variables evaluadas fueron número de brotes por explante, longitud y número de nudos de los 2 brotes más largos y cualitativamente el vigor.

3.4.5 Diseño experimental

Todos los experimentos se realizaron bajo el diseño completamente al azar con un mínimo de 10 repeticiones por tratamiento y los datos fueron analizados con el programa SAS 9.0 (Statistical Analysis System), y la prueba de medias de acuerdo a Duncan con $p \leq 0.5$. Se utilizaron frascos de vidrio con 20 mL de medio de cultivo cada uno.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Organogénesis indirecta

Respuesta de los segmentos nodales y de hoja de cosmos chocolate en la formación de callo con 2,4-D.

En segmentos nodales de ambos clones Hgo 1 y 5, no hubo ninguna formación de callos, con segmentos de hoja se logró obtener el 50 % de formación de callos con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (Cuadro 1) (Figura 3). En el caso del clon Hgo 5 no mostró respuesta de formación de callos en segmentos de hoja (Figura 4).

Cuadro 1. Clon Hgo 1, obtención de callos con 2,4-D en segmentos de hoja.

Tratamientos (mg L ⁻¹ de 2,4-D)	Explantes con callo (%)	Explantes muertos (%)
0	0	100
0.5	0	100
1	50	50
2	45	55

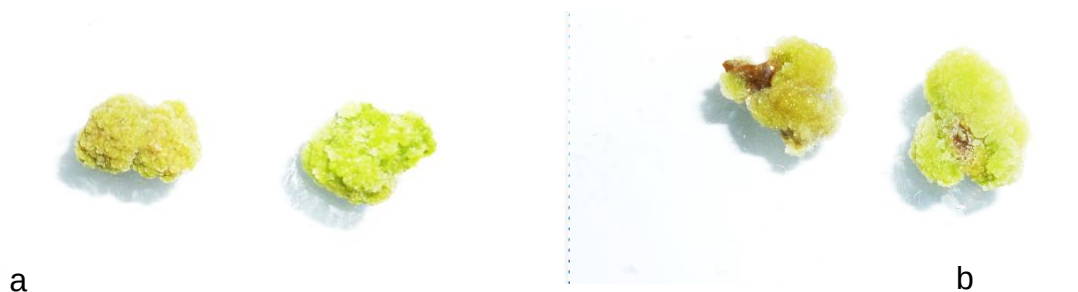


Figura 3. Callos formados con; a: 1 mg L⁻¹ y b: 2 mg L⁻¹ de 2,4-D en clon Hgo 1



Figura 4. Segmentos de hoja en 2,4-D, sin formación de callo.

Respuesta de los segmentos de hoja y nudos de cosmos chocolate en la formación de callos con BA

Hubo mejor respuesta a la formación de callo en segmentos de hoja con el uso de BA, la concentración de 2 mg L⁻¹ fue donde se obtuvo un 66.7 % de formación de callos que fue más alto que los demás tratamientos, se observa una tendencia a aumentar la formación de callos a medida que la concentración de BA aumenta hasta llegar a 2 mg L⁻¹, ya que con 3 mg L⁻¹, la respuesta disminuye (Cuadro 2) (Figura 5).

En los segmentos nodales que se utilizaron para organogénesis directa de los clones Hgo 3, 4 y 5, hubo 100 % de formación de callos en los tratamientos que contenían BA.

Cuadro 2. Clon Hgo 5, obtención de callos con BA en segmentos de hoja

Tratamientos (mg L ⁻¹ de BA)	Explantos con callo (%)	Explantos muertos (%)
0	0	100
0.5	11.1	88.9
1	33.3	66.7
2	66.7	33.1
3	50	50

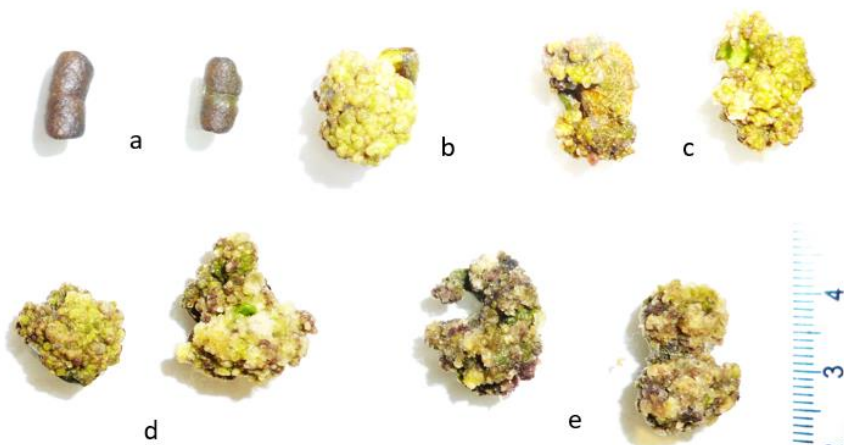


Figura 5. Obtención de callos con BA, a: 0 mg L⁻¹ b: 0.5 mg L⁻¹ c: 1 mg L⁻¹ d: 2 mg L⁻¹ e: 3 mg L⁻¹

Estos resultados son diferentes a los reportados por Oku *et al.* (2009), donde obtuvo formación de callos con 2,4-D 0.1 mg·L⁻¹, en el clon cultivado, por lo que se podría inferir que en especies silvestres puede haber algún factor que dificulta la respuesta al 2,4-D en la formación de callo.

Sin embargo, los resultados en segmentos de hoja y nudos usando BA, son similares a los de Wilkinson *et al.* (2003) donde mencionan que *Cosmos atrosanguineus* respondía bien al cultivo *in vitro* ya que obtuvo callos en medio MS adicionando 0.5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 0.01 mg L⁻¹ de ácido

naftalenacético (ANA) por lo que, para la obtención de callos es mejor usar BA a una concentración de 2 mg L⁻¹.

3.5.2 Organogénesis directa; respuesta de los 5 clones silvestres en la formación de brotes a partir de segmentos nodales

La respuesta a la obtención de brotes a partir de segmentos nodales en los 5 clones evaluados utilizando diferentes concentraciones de BA fue variable. El clon Hgo 1 mostró una gran respuesta al BA desde 1.5 brotes por nudo en la concentración de 0.5 mg L⁻¹ y hasta 12.6 brotes en la concentración de 3 mg L⁻¹, sin embargo, la longitud se ve afectada drásticamente ya que, a mayor número de brotes por nudo, la longitud disminuyó (Cuadro 3) (Figura 6).

Cuadro 3. Clon Hgo 1, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA

Tratamientos (mg L ⁻¹ de BA)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes
0	1.2 b ^z	5.2 a	5 a	100	50 % Bajo, 50 % medio
0.5	1.5 b	3.0 b	4.3 b	100	100 % Medio
1	10.8 a	0.9 c	2.4 c	71.4	100 % Bajo
2	12.2 a	0.7 c	2.1 c	71.4	100 % Bajo
3	12.6 a	0.5 c	2.1 c	80	100 % Bajo
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	3.08	0.47	0.44		
3	3.02	0.50	0.47		
4	3.33	0.52	0.48		
5	3.40	0.53	0.49		

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa



Figura 6. Brotes obtenidos del clon Hgo 1 con BA (mg L^{-1})

En el caso del Clon Hgo 2 no se observó diferencias del número de brotes por nudo entre los tratamientos con BA, excepto con el control donde solo se obtuvo 1 brote por segmento nodal, lo mismo para el caso de la longitud de brotes que todos los tratamientos superaron los 2 centímetros, pero no rebasaron los 3 centímetros, sin embargo, el vigor fue mejor a medida que aumentaba la concentración de BA siendo mayor con 3 mg L^{-1} (Cuadro 4) (Figura 7).

Cuadro 4. Clon Hgo 2, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA

Tratamientos (mg L^{-1} de BA)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes
0	1.0 b ^z	2.7 a	3.0 b	83.3	90 % bajo, 10% medio
0.5	1.5 a	2.5 a	3.8 a	91.6	62.5 % bajo, 37.5 % medio
1	1.4 a	2.1 a	3.6 a	83.3	69.2 % bajo, 30.8 % medio
2	1.8 a	2.3 a	4.0 a	100	53.3 bajo %, 46.7 % medio
3	1.9 a	2.1 a	3.8 a	100	21.1 % bajo, 78.9 % medio
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	0.42	0.97	0.67		
3	0.44	1.02	0.70		
4	0.45	1.05	0.73		
5	0.46	1.07	0.74		

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa

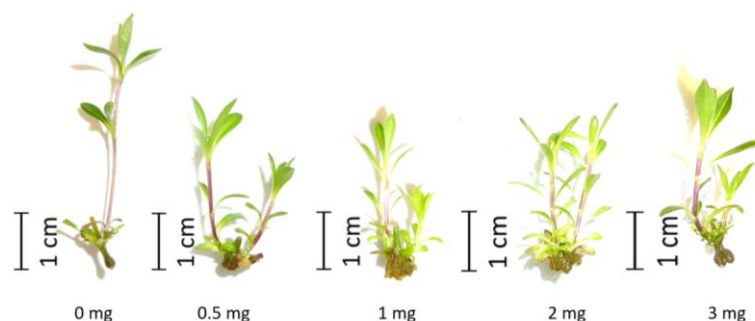


Figura 7. Brotes obtenidos del clon Hgo 2 con BA (mg L^{-1})

Para el clon Hgo 3 los tratamientos 1, 2 y 3 mg L^{-1} fueron superiores al control respecto al número de brotes por nudo, la longitud y número de nudos desarrollados fueron superiores en todos los tratamientos con BA, sin embargo, los tratamientos con 2 y 3 mg L^{-1} de BA fueron mejores en vigor, una respuesta diferente a los clones Hgo 1 y 2 fue la formación de callo en la base de los nudos, tal característica puede ser una ventaja para la obtención de mayor número de brotes y con 2 y 3 mg L^{-1} los callos fueron más grandes y de mayor peso (Cuadro 5) (Figura 8).

Cuadro 5. Clon Hgo 3, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA

Tratamientos (mg L^{-1} de BA)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes	Peso del callo (g)
0	1.3 c ²	2.6 b	2.6 b	100	37.5 % bajo, 50 % medio, 12.5 % alto	0 c
0.5	1.5 bc	6.7 a	4.2 a	100	73.6 % medio, 26.4 % alto	0.30 b
1	1.8 ab	6.4 a	4.5 a	100	86.3 % medio, 13.7 % medio	0.30 b
2	2.0 a	5.9 a	4.1 a	100	87.5 % medio, 12.5 % alto	0.44 a
3	1.9 a	5.4 a	4.1 a	100	59.1 % medio, 40.9 % alto	0.48 a
(DMS) Número de medias		Rango crítico				
2	0.31	1.30	0.50			0.10
3	0.33	1.37	0.53			0.10
4	0.34	1.42	0.55			0.11
5	0.35	1.45	0.56			0.11

² Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa



Figura 8. Brotes obtenidos del clon Hgo 3 con BA (mg L^{-1})

La respuesta del clon Hgo 4 en el número de brotes también fue mejor cuando se le agregó BA que cuando el medio de cultivo no contenía esta hormona, sin BA solo produjo un brote por nudo y con BA se obtuvo más de 1 brote, sin embargo, dentro de los tratamientos con BA no hubo diferencias estadísticas en esta variable, la longitud del brote si se observó mejor respuesta con BA pasando de 2.5 cm en el control sin BA a 4 cm en los tratamientos con BA, el vigor de los brotes se favoreció con 1 mg L^{-1} de BA donde el 50 % de los brotes presentó vigor alto, este clon también presentó formación de callo y la mejor respuesta se obtuvo con 2 y 3 mg L^{-1} de BA (Cuadro 6) (Figura 9).

Cuadro 6. Clon Hgo 4, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA

Tratamientos (mg L ⁻¹ de BA)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes	Peso del callo (g)
0	1.0 b ^z	2.5 b	2.4 b	100	58.3 % bajo, 41.7 % medio	0.0 c
0.5	1.5 a	4.6 a	4.6 a	100	16.6 % bajo, 50 % medio, 33.4 % alto	0.30 b
1	1.6 a	4.2 ab	4.3 a	100	50 % medio, 50 % alto	0.30 b
2	1.8 a	4.3 a	4.9 a	100	72.7 % medio, 27.3 % alto	0.52 a
3	1.6 a	3.8 ab	4.5 a	100	60 % medio, 40 % alto	0.42 ab
(DMS) Número de medias Rango crítico						
2	0.46	1.5	0.92			0.19
3	0.48	1.6	0.97			0.20
4	0.49	1.7	1.01			0.20
5	0.50	1.7	1.02			0.21

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa



Figura 9. Brotes obtenidos del clon Hgo 4 con BA (mg L⁻¹)

En el clon Hgo 5 no hubo diferencias estadísticas en el número de brotes por nudo, todos los tratamientos produjeron más de un brote por nudo, en la longitud del brote hubo una respuesta favorable a los tratamientos con BA siendo superior por al menos un centímetro, el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA dio brotes más vigorosos y con mayor formación de callo, con 2 y 3 mg L⁻¹ de BA también mostraron buena respuesta en la formación de callo (Cuadro 7) (Figura 10).

Cuando se usaron callos provenientes del experimento con segmentos de nodales del clon Hgo 5 tratados con BA, estos mostraron una respuesta favorable

a formación de brotes excepto al control donde se colocó en medio base sin BA, el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA fue mejor en longitud con un promedio de 8.2 cm, y 5.1 brotes por callo, aunque los brotes de mayor vigor se obtuvieron con 2 mg L⁻¹ de BA , los callos dieron mejor resultado en cuanto a número de brotes que los segmentos nodales en este clon(Cuadro 8) (Figura 11)

Cuadro 7. Clon Hgo 5, organogénesis directa a partir de segmentos nodales con BA.

Tratamientos (mgL ⁻¹ de BA)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes	Peso del callo (g)
0	1.9 a ^z	2.2 b	3.1 b	90.9	83.3 % medio, 16.7 % alto	0.0 c
0.5	2.0 a	3.2 a	4.1 a	100	29.2 % medio, 70.8 % alto	0.48 b
1	2.0 a	3.5 a	4.2 a	100	33.3 % medio, 66.7 % alto	0.61 ab
2	2.0 a	3.3 a	4.3 a	85.7	50 % medio, 50 % alto	0.67 a
3	2.0 a	3.6 a	4.4 a	92.3	25 % bajo, 54.2 % medio, 20.8 % alto	0.63 a
(DMS) Número de medias						
Rango crítico						
2	0.10	0.46	0.42			0.13
3	0.10	0.48	0.44			0.13
4	0.11	0.50	0.45			0.14
5	0.12	0.51	0.46			0.14

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa.



Figura 10. Brotes obtenidos del clon Hgo 5 con BA (mg L⁻¹)

Cuadro 8. Organogénesis indirecta: formación de brotes en clon Hgo 5

Tratamientos (mgL ⁻¹ de BA)	Brotes por callo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de callos que brotaron	Vigor de los brotes	Peso del callo (g)
0	0.25 c ^z	0.62 c	1.5 c	25	100% medio	0.5 c
0.5	2.1 bc	5.5 b	6.0 b	100	8.3 % bajo, 25 % bajo, 66.7 % alto	1.0 b
1	5.1 a	8.2 a	7.4 a	100	8.3 % bajo, 75 % medio, 16.7 % alto	1.4 ab
2	5.6 a	6.7 b	6.9 ab	100	10 % bajo, 50 % medio, 40 % alto	1.5 a
3	4.3 ab	6.1 b	6.5 ab	100	30 % bajo, 60 % medio, 10 % alto	1.5 a
(DMS) Número de medias						
Rango crítico						
2	2.20	1.26	1.16			0.39
3	2.31	1.32	1.22			0.41
4	2.38	1.37	1.26			0.43
5	2.43	1.40	1.29			0.44

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa



Figura 11. Hgo 5, formación de brotes a partir de callos con BA (mg L⁻¹)

La tendencia general de los clones muestra resultados similares a concentraciones de 1 y 2 mg L⁻¹, la única excepción es el clon Hgo 1, por debajo de estas concentraciones la respuesta es muy variable para cada clon (Figura 12). En longitud de brotes se observa una mejor respuesta a una concentración de 0.5 y 1 mg L⁻¹ de BA en todos los clones y se observa una ligera tendencia a

disminuir a concentración superior de 1 mg L⁻¹, esto está ligado a un mayor número de brotes lo que provoca menos crecimiento de brotes (Figura 13).

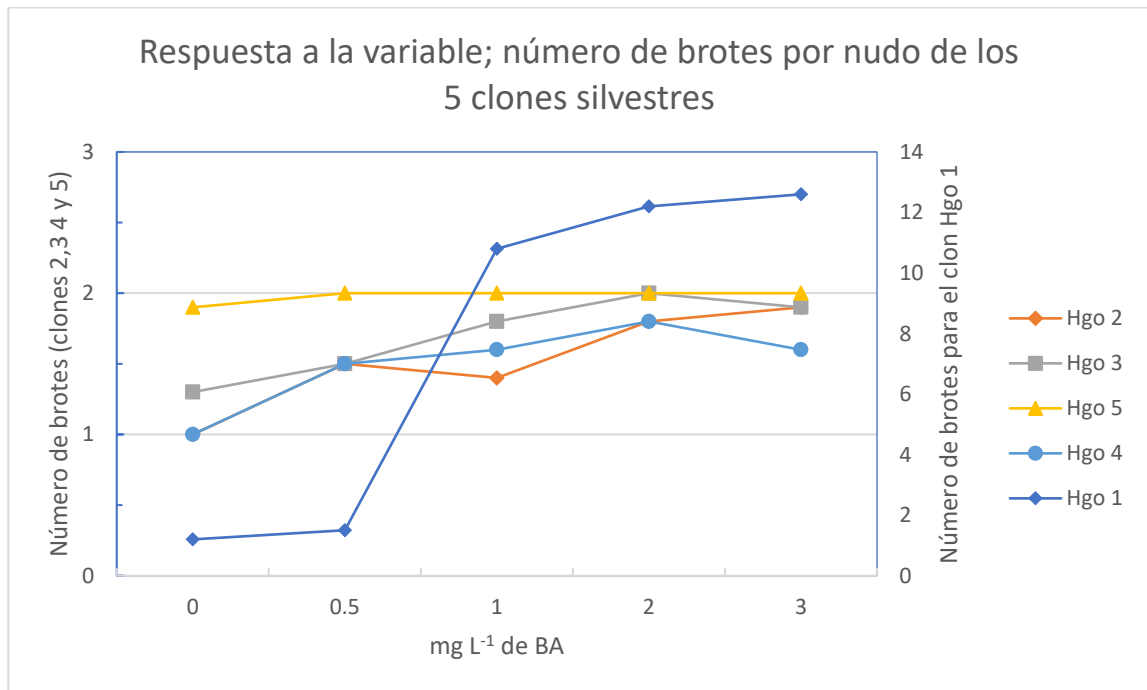


Figura 12. Respuesta de los 5 clones a BA en la variable brotes por nudo

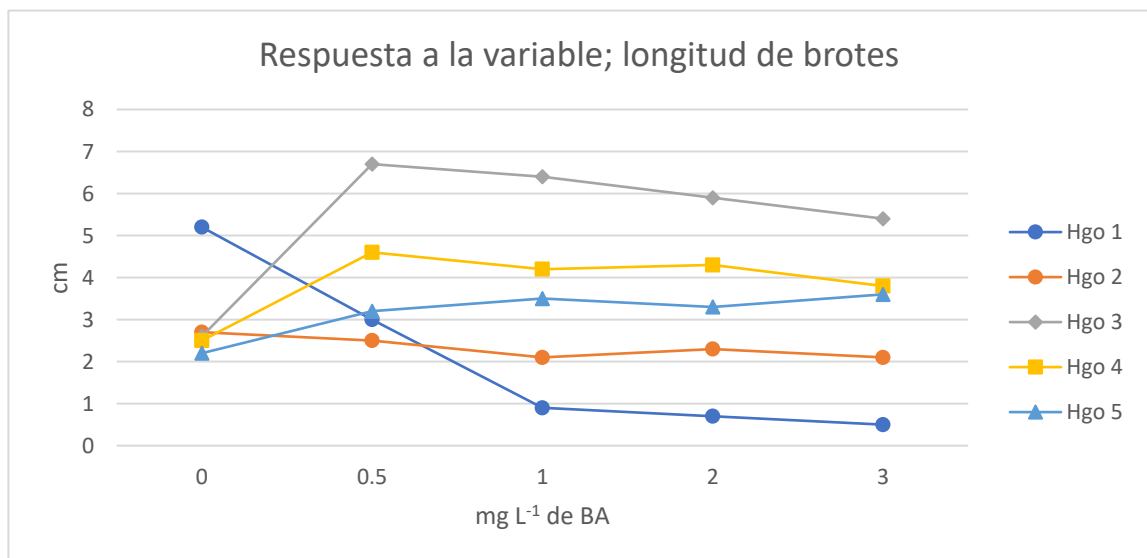


Figura 13. Respuesta en la longitud de brotes de los 5 clones

Los genotipos silvestres mostraron una respuesta favorable en la obtención de brotes con BA a partir de segmentos nodales y sin vitrificación, estos resultados

son similares a los obtenidos por Hosoki *et al.* (1993) con benciladenina (BA) donde a partir de segmentos nodales logró micropropagar con éxito cosmos chocolate, la tasa de multiplicación óptima fue de 3.7 brotes por un periodo de cultivo de 17 días y se logró sin la vitrificación de los explantes con 0.2 mg L⁻¹ de BA, la tasa más alta de regeneración (80 %), el número de brotes (5.3) por sección de entrenudos la obtuvo en el medio con solo 1 mg L⁻¹ de BA.

También son similares a los obtenidos por Wilkinson *et al.* (2003) quienes mencionan que *Cosmos atrosanguineus* respondía bien al cultivo *in vitro* y obtuvo brotes de callos en medio MS adicionando 0.5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BA) y 0.01 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), es decir en un balance de citocininas y auxinas, los brotes que se obtuvieron fueron normales y no presentaron vitrificación lo mismo se obtuvo en los clones silvestres evaluados, todos los brotes fueron normales sin presentarse el fenómeno de 3 hojas por nudo. También se observó en 3 de los genotipos la formación de callo con BA, esto nos muestra que en genotipos silvestres existen ejemplares que responden de forma diferente a los fitorreguladores, otra respuesta clave para comprobar que responden de forma diferente fue el clon Hgo 1, el cual parece tener una alta sensibilidad al BA, además que junto con el clon Hgo 2 no formaron callo.

3.5.3 Respuesta al fotoperiodo en la obtención de brotes con segmentos nodales de cosmos chocolate

La respuesta a fotoperiodo en el clon Kew fue mínima, sin resultados muy contrastantes entre tratamientos, ya que el número de brotes por nudo se mantuvo alrededor de 2 y 3, la longitud solo fue superior con 8 horas de fotoperiodo, donde alcanzó 3.6 cm, sin embargo, esto podría ser por la falta luz que los brotes se alargaron más, pero con menor vigor. Los demás tratamientos incluyendo 16 horas, lo que comúnmente se maneja en el laboratorio no alcanzaron los 3 cm de longitud. Así mismo el vigor fue mejor a 14 y 16 horas luz, con un porcentaje mayor de brotes de vigor medio (Cuadro 9) (Figura 14).

En el clon silvestre Hgo 1 la respuesta fue similar a la del clon Kew, sin embargo, la longitud de brotes fue menor ya que los brotes no rebasaron el centímetro, esto fue parecido a lo que se obtuvo en la etapa de multiplicación evaluando las concentraciones de BA, con 14 horas luz fue el superior entre los demás tratamientos pero no es significativo comparado con lo que se obtuvo solo aplicando BA (Cuadro 10) (Figura 15).

cuadro 9. Clon Kew y su respuesta en la formación de brotes a partir de segmentos nodales en diferentes fotoperiodos

Fotoperiodo (horas luz)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes
8	2.5 a ^z	3.6 a	4.2 a	100	100 % bajo
10	3.0 a	2.4 b	3.4 b	100	100 % bajo
12	3.4 a	2.4 b	3.4 b	100	100 % bajo
14	3.3 a	2.6 b	3.3 b	100	52.3 % bajo, 48.7 % medio
16	3.4 a	2.3 b	3.1 b	100	100 % medio
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	1.02	0.51	0.41		
3	1.07	0.53	0.43		
4	1.10	0.55	0.44		
5	1.13	0.56	0.45		

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: Diferencia mínima significativa.



Figura 14. Clon Kew, respuesta al número de brotes en segmentos nodales con diferentes fotoperiodos

Cuadro 10. Clon Hgo 1 y su respuesta en la formación de brotes a partir de segmentos nodales en diferentes fotoperiodos

Fotoperiodo (horas luz)	Brotes por nudo	Longitud de brote (cm)	Número de nudos por brote	Porcentaje de nudos que brotaron	Vigor de los brotes
8	2.7 c ^z	0.5 b	2 a	100	100% Bajo
10	4.3 ab	0.7 b	2.1 a	100	100% Bajo
12	3.1 bc	0.7 b	2.2 a	100	100% Bajo
14	3.7 bc	1.0 a	2.3 a	100	100% Bajo
16	5.1 a	0.7 b	2.1 a	100	100 % Bajo
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	1.33	0.19	0.31		
3	1.40	0.20	0.32		
4	1.44	0.21	0.33		
5	1.48	0.22	0.34		

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$. DMS: Diferencia mínima significativa.



Figura 15. Respuesta a la variable número de brotes a partir de segmentos nodales con diferentes fotoperiodos

Los resultados obtenidos muestran que en la etapa de multiplicación *in vitro*, cosmos chocolate no muestra respuestas significativas en cuanto a la regulación de la brotación, en contraste a lo observado en plantas *ex vitro* como lo muestra el trabajo de Kanellos y Pearson (2000), donde el fotoperiodo afectó drásticamente la morfología de la planta, con fotoperiodos largos (17 horas por día) que conducen a un aumento de más de 7 veces en la masa de la planta, mayor número de ramas, en comparación con los días cortos (8 h por día), esto posiblemente por el tipo de luz proporcionada o la edad del explante.

3.6 Conclusiones

Todos los clones silvestres evaluados presentaron diferentes respuestas morfogénicas durante la etapa de multiplicación *in vitro*.

Con 2 mg L⁻¹ de BA resultó ser mejor para la formación de callos en segmentos de hoja.

A concentraciones de 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹ de BA se obtuvo la mejor respuesta en el número de brotes y formación de callos en segmentos nodales de los clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

A concentraciones de 0.5 y 1 mg L⁻¹ se obtuvieron brotes con mayor longitud en los clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

Con fotoperiodos por debajo de 16 horas luz no se observa mejor respuesta a las obtenidas normalmente con 16 horas luz en la obtención de mayor número y longitud de brotes en la etapa de multiplicación *in vitro*.

3.7 Recomendaciones

Para la etapa de formación de callos con segmentos de hoja, se sugiere probar concentraciones superiores a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, al igual que otras citocininas no probadas en este trabajo.

También se sugiere probar otras citocininas para la etapa de organogénesis directa con todos los clones.

Se recomienda probar diferentes intensidades de luz y tipos de luz para descartar el efecto del fotoperiodo.

3.8 Literatura citada

- Daves, G. (2015). *Chocolate cosmos (Cosmos atrosanguineus)*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de <http://davesgarden.com>.
- Fay, M. F., & Hind, N. (2003). *Cosmos atrosanguineus* Compositae. *Curtis's Botanical Magazine*, 20(1), 40-48.
- Gómez, P. D., y Morales V. B. (2015). Inducción *In vitro* de raíces tuberosas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, 71: 40-61.
- Harven, S. (2015). *Chocolate cosmos (Cosmos atrosanguineus), flowers*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de <https://www.sarahraven.com>.
- 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.
- Kanellos, E., & Pearson, S. (2000). Environmental regulation of flowering and growth of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Scientia Horticulturae*, 265-274.
- Lorenzo, I. A. (2006). Enraizamiento *in vitro* y desarrollo *in vivo* de cosmos (*cosmos atrosanguineus* Sherff.). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, 53: 29-45.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.

- 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. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 323-327.
- Ortega, P. E. (1991). Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México. *SOMEFI*, 449: 417-437.
- Ortega-Larrocea, M., Chávez, M., & Bye Boettler, R. (1997). Micropropagación y establecimiento ex vitro de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranto*, 10, 1-9.
- Rodriguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del Género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 610-619.
- SAS Institute Inc. (2014). Introducción a la programación en SAS® Studio 3.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- UPOV. (2015). *International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de Database Plant Variety: <http://www.upov.int>
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann Bot.*, 91(1), 65-74.

4. VARIACIÓN MORFOGÉNÉTICA EN CLONES SILVESTRES DE COSMOS CHOCOLATE (*Cosmos atrosanguineus* sherff.) DURANTE SU MICROPROPAGACIÓN: ETAPA III ENRAIZAMIENTO

4.1 Resumen

Cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) es una especie ornamental endémica de México. En el año 2015 se colectó una escasa población silvestre de cosmos chocolate. Con el propósito de estudiar la respuesta morfogénética *in vitro*, en la etapa de enraizamiento, se evaluaron seis clones, uno cultivado y 5 silvestres. Se evaluó al clon cultivado y su respuesta al floroglucinol durante el enraizamiento; el efecto de la sacarosa y fotoperiodo en el enraizamiento fue evaluado en el clon cultivado y uno silvestre. Los resultados muestran que el floroglucinol duplicó el número de raíces por brote pasando de 11.1 a 24.2 raíces por explante. La sacarosa disminuyó la longitud de raíces y la longitud del brote a medida que aumentó su concentración de 3 a 6 % en ambos clones evaluados. No se observó un efecto claro en los fotoperiodos probados sobre el número de raíces y su longitud, pero brotes más vigorosos y de menor tamaño fueron observados a 14 y 16 horas de fotoperido. Por lo que se concluye que el floroglucinol funcionó favorablemente como un cofactor de enraizamiento, la sacarosa en concentraciones mayores de 3 % afecta negativamente el desarrollo de las raíces y el fotoperiodo no tiene un efecto significativo en la etapa de enraizamiento *in vitro* de cosmos chocolate

Palabras clave: cofactor, clon, morfogénética, raíces, silvestre

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Director de Tesis: Juan Martínez Solís

4.2 Abstract

MORPHOGENETIC VARIATION IN WILD CLONES OF CHOCOLATE COSMOS (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.) DURING ITS PROPAGATION: STAGE III ROOTING

Abstract

The chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) is an ornamental species endemic from Mexico. In 2015, a wild population of chocolate cosmos was collected. In order to study the *in vitro* morphogenetic response in this species, five wild clones and a cultivated one were evaluated. In a cultivated and wild clone the effect of sucrose and photoperiod on rooting, were evaluated. The response to phloroglucinol during rooting in the cultivated clone was also assessed. The results show that; Phloroglucinol doubled the root number per shoot from 11.1 to 24.2. Root length decreased as sucrose concentration increased. Sucrose reduces the length of the root and the length of the stem as the concentration increased from 3 to 6%. No clear effect was observed in the photoperiods tested, but more vigorous and smaller shoots were observed with 14 and 16 hours of photoperiod. It is concluded that phloroglucinol worked favorably as a rooting cofactor, sucrose in concentrations higher than 3% negatively affects the development of the roots and the photoperiod does not have a significant effect in the *in vitro* rooting stage of the chocolate cosmos.

Key words: cofactor, clone, morphogenetic, roots, wild.

Master's Thesis in Science in Horticulture, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Bulmaro Morales Vázquez
Advisor: Juan Martínez Solís

4.3 Introducción

Cosmos chocolate es endémica de México es una planta con gran valor ornamental, sin embargo, es poco conocida en su país de origen, su principal atractivo es el aroma a chocolate que desprende de sus flores, además del color guinda de la flor (Fay & Hind, 2003), no se tienen clones comerciales en México (Rodríguez *et al.* 2006), sin embargo, es una planta comercializada en varios países del mundo, entre ellos destacan, Japón, Nueva Zelanda, EE.UU., Inglaterra y países de la Unión Europea, se ofrece en presentaciones principalmente como flor de maceta, aunque también como flor para jardín y flor de corte y se encuentran varias patentes registradas (UPOV, 2015). El clon cultivado con el que se cuenta de esta especie es autoincompatible, esto limita a que su propagación sea por la vía asexual, una característica de esta planta es que produce raíces tuberosas (Fay & Hind, 2003). La división de camotes y micropropagación son las vías por la cuales se propagan para la venta comercial de estas especies, la micropropagación es la vía más rápida, este proceso se lleva generalmente en 4 etapas; introducción del material vegetal, multiplicación del material vegetal, enraizamiento de explantes y aclimatación de plantas enraizadas (Murashige, 1974).

Existen algunos trabajos reportados acerca de la micropropagación, donde en la parte de enraizamiento se cuenta con pocos estudios. Ya que la mayoría ha sido realizado con fines de conservación de esta especie en cultivo *in vitro*, uno de los primeros fue realizado por Hosoki *et al.* (1993), logrando su micropropagación con secciones de tallos con nudos y el uso de benciladenina (BA) en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), Ortega *et al.* (1997), desarrollaron protocolos con el fin de reintroducir la especie a su medio natural, Oku *et al.* (2000), realizaron un experimento para la regeneración de *C. atrosanguineus*, más tarde Wilkinson *et al.* (2003) realizaron trabajos de crio-preservación, mientras que Cervantes *et al.* (1999) usaron para el enraizamiento MS 50 % líquido, con AIB 1 mg·L⁻¹ y Lorenzo (2006) realizó trabajos de micropropagación y enraizamiento de explantes de cosmos chocolate, donde a concentraciones de 1 mg L⁻¹ de AIB y

ANA, más 100 mg L⁻¹ logró 83 % de enraizamiento, con un máximo de 11.2 raíces, Gómez y Morales en 2015, realizaron trabajos de enraizamientos de explantes y con 0.8 mg L⁻¹ de ANA y 1 mg L⁻¹ de AIB lograron un 100 % de enraizamiento. Todos estos trabajos han sido realizados con el clon cultivado de Kew, sin embargo, para material silvestre que presenta diferentes respuestas morfogénicas en cultivo *in vitro* como los materiales recientemente colectados por investigadores de la Universidad Autónoma Chapingo en el año 2015, no se tienen protocolos descritos, ni se ha reportado trabajos con material silvestre de esta especie, es por eso que este trabajo tiene como objetivo estudiar la respuesta morfogénica *in vitro* en la etapa de enraizamiento, para desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación en materiales silvestres que permitan su eficiente multiplicación *in vitro*.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Ubicación de los experimentos y material vegetal utilizado

El material vegetal utilizado fue colectado de plantas de *C. atrosanguineus* que se encontraban en estado silvestre en un sitio ubicado en la sierra de Zimapán del estado de Hidalgo, México. Segmentos nodales se introdujeron a cultivo *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Autónoma Chapingo. Los segmentos nodales se mantuvieron en medio de multiplicación hasta obtener brotes de al menos 2 cm de longitud (Figura 16), el medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado con 120 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina, y adicionando 0.2 mg L⁻¹ de ácido naftalenácetico (ANA) y 2 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) (Gómez y Morales, 2015). Al final se lograron mantener 5 clones nombrados Hgo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, más un clon cultivado que se tenía proveniente del jardín botánico de Kew, Inglaterra al que se le denominó Kew.



Figura 16. Explantes usados para el enraizamiento.

4.4.2 Pruebas con sacarosa

De los explantes mantenidos en medio de multiplicación (medio MS modificado con 120 mg L^{-1} de mioinositol, 4 mg L^{-1} de tiamina, 2 mg L^{-1} de BA y 0.2 mg L^{-1} de ANA) fueron seleccionados aquellos que tenían mismo vigor y 2 cm de longitud para realizar los experimentos de enraizamiento.

El medio utilizado para el enraizamiento fue medio MS modificado con 120 mg L^{-1} de mioinositol, 4 mg L^{-1} de tiamina y 50 mg L^{-1} de floriglucinol. Para el primer experimento se utilizó el clon cultivado de Kew y el clon Hgo 5, donde se usaron 3 concentraciones de sacarosa; 3, 6 y 9 %, adicionalmente se colocó un control el cual fue con 0 % de sacarosa. Se utilizaron tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo.

4.4.3 Pruebas con floriglucinol

Para este experimento también se usaron explantes que se mantuvieron en medio de multiplicación, se seleccionaron brotes de 2 cm de longitud y mismo vigor. El material vegetal utilizado fue el clon kew.

Se utilizó para el enraizamiento el medio MS modificado con 120 mg L^{-1} de mioinositol, 4 mg L^{-1} de tiamina, 3 % de sacarosa y 50 mg L^{-1} . Para este

experimento se probaron 4 concentraciones de floroglucinol; 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹ más un control con 0 mg L⁻¹. Se utilizaron tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo.

4.4.4 Tratamientos con fotoperiodo

Se utilizaron explantes de 2 cm de longitud y mismo vigor que provenían de medio de multiplicación. En este caso primero se estableció un experimento con 5 tratamientos; 8, 10, 12, 14 y 16 horas luz utilizando el clon Kew, posteriormente se realizó un segundo experimento utilizando segmentos del clon Hgo 5, con 8, 12, 14 y 16 horas de luz, el control en ambos experimentos fue el tratamiento con 16 horas luz ya que son las condiciones normales de laboratorio.

Para el enraizamiento se usó el medio MS modificado con 120 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 mg L⁻¹ de tiamina y 3 % de sacarosa. Se utilizaron tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo.

4.4.5 Variables evaluadas

Las variables evaluadas en todos los experimentos fueron; número de raíces por brote, longitud promedio de las 3 raíces más largas por brote, longitud y número de nudos del brote y de forma cualitativa el vigor del brote (bajo, medio y alto) (Figura 17; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

4.4.6 Diseño experimental

El diseño experimental fue el de completamente al azar y la prueba de medias fue de acuerdo a la de Duncan con $p \leq 0.05$. Todos los experimentos se colocaron con un mínimo de 10 repeticiones. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS 9.0.

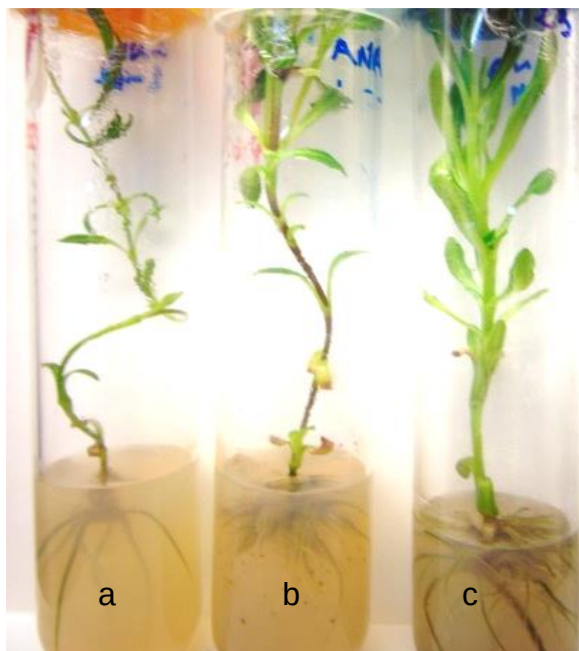


Figura 17. Escala de vigor en los brotes evaluados; a: bajo, b: medio, c: alto

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Respuesta del floriglucinol en el enraizamiento

El efecto del floriglucinol como cofactor de enraizamiento se vio claramente superior con al menos el doble de raíces comparado con el tratamiento sin floriglucinol, pasando de 11.1 raíces sin floriglucinol a 24.2 raíces en el tratamiento de 25 mg L⁻¹ de floriglucinol, dentro de los tratamientos con floriglucinol no hubo diferencias significativas, la longitud de raíces fue ligeramente superior con 50 y 75 mg L⁻¹ pero estadísticamente no hubo diferencias, en la longitud del brote fue superior con los tratamientos de floriglucinol, mostrando una correlación con el número de raíces, por lo que el mejor tratamiento considerando el vigor de los brotes y número de raíces fue con 75 mg L⁻¹ (Cuadro 11) (Figura 18).

Cuadro 11. Clon cultivado de Kew y su respuesta al enraizamiento con floroglucinol

Floroglucinol (mg L ⁻¹)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Longitud del brote (cm)	Número de nudos del brote	Vigor de los brotes
0	11.1 b ^z	5.8 a	12 b	9.1 c	62.5 % medio, 37.5 % alto
25	24.2 a	6.6 a	17.8 a	11.3 a	25 % medio, 75 % alto
50	29.6 a	7.0 a	17.6 a	10.1 abc	50 % medio, 50 % alto
75	28.4 a	6.1 a	17.6 a	11.1 ab	25 % medio, 75 % alto
100	26.5 a	5.4 a	16.2 a	9.7 bc	75 % medio, 25 % alto
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	8.03	1.53	2.47	1.39	
3	8.45	1.61	2.60	1.46	
4	8.71	1.66	2.68	1.51	
5	8.91	1.70	2.74	1.54	

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$; DMS: diferencia mínima significativa.



Figura 18. Clon Kew, respuesta al número de raíces con floroglucinol

Los resultados obtenidos apoyan a lo mencionado por Pierik (1990), Hammat (1994), al utilizar floroglucinol más auxinas en brotes de cerezo observó mayor enraizamiento, Hunter (2015) menciona que el floroglucinol aplicado junto con auxinas, actúa de forma sinérgica, induciendo la formación de raíces adventicias, Jankiewicz (1989) menciona como sinergistas de auxinas y Jankiewicz, *et al.* (2003), mencionan que, para estimular el enraizamiento en cultivo de tejidos, se usa el floroglucinol, todos estos autores refuerzan los resultados aquí obtenidos, en el enraizamiento de *C. atrosanguineus*, favoreciendo la acción de las auxinas con un mayor número de raíces al aplicar floroglucinol al medio de cultivo.

4.5.2 La sacarosa y su efecto en el enraizamiento

El efecto de la sacarosa en el enraizamiento fue notable en todos los tratamientos del clon Kew se mostró alguna diferencia ya sea el número de raíces o la longitud de estas. Con 0 % no hubo presencia de raíces, con el 3 % de sacarosa se obtuvo la mejor respuesta a longitud de raíces y brote, en el número de raíces no mostró diferencia con 6 y 9 %, la tendencia en el número de raíces fue de aumentar conforme aumentaba la concentración de sacarosa, pero la longitud de raíces disminuyó al igual que la longitud del brote en los tratamientos con 6 y 9 % de sacarosa, con el tratamiento de 6 % fueron brotes de mejor vigor (Cuadro 12) (Figura 19)

Cuadro 12. Clon Kew y su respuesta a la sacarosa en el enraizamiento

Sacarosa (%)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Longitud del brote (cm)	Número de nudos por brote	Vigor del brote
0	0.0 b	0.0 d	2.5 c	2.5 c	100 % bajo
3	14.6 ab	3.1 a	15.5 a	9.5 a	100 % medio
6	18.1 a	2.2 b	9.3 b	8.0 b	100 % alto
9	26.1 a	1.1 c	2.8 c	3.1 c	25 % bajo, 75 % medio
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	14.94	0.61	1.18	1.01	
3	15.68	0.65	1.24	1.05	
4	16.15	0.66	1.28	1.08	

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$; DMS: diferencia mínima significativa.

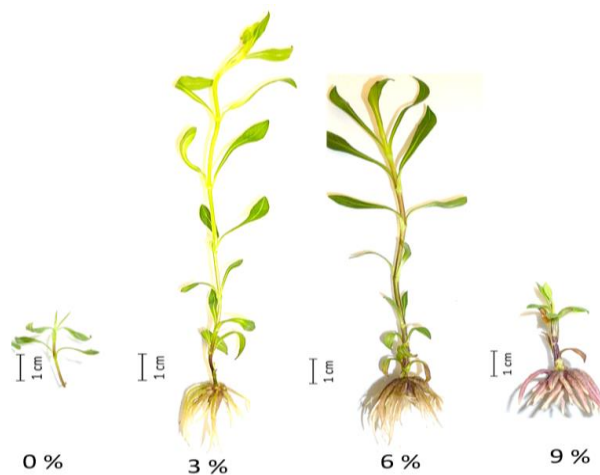


Figura 19. Clon kew, enraizamiento bajo diferentes concentraciones de sacarosa

Para el caso del clon Hgo 5 que presentaba un desarrollo más vigoroso a comparación del clon cultivado Kew, siguió la misma tendencia en la respuesta a la sacarosa, en el número de raíces por explantes no hubo diferencias significativas en los tratamientos con sacarosa, aunque en los tratamientos con sacarosa al menos se obtuvieron 10 raíces y en el control no se desarrollaron raíces, la longitud de raíces y del brote disminuyó en las concentraciones de 6 y 9 %, pero el mejor vigor de los brotes se obtuvo con el 3 y 6 % (Cuadro 13) (Figura 20).

Cuadro 13. Clon Hgo 5 y su respuesta a la sacarosa en el enraizamiento.

Sacarosa (%)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Longitud del brote (cm)	Número de nudos por brote	Vigor del brote
0	0.0 b ^z	0.0 d	2.4 c	2.8 c	100 % bajo
3	14.4 a	8.7 a	8.0 a	10.4 a	100 % alto
6	13.4 a	5.4 b	5.2 b	7.8 b	100 % alto
9	10.0 a	1.8 c	2.6 c	2.8 c	28.5 % medio, 71.5 % alto
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	4.34	0.76	0.58	0.85	
3	4.55	0.79	0.61	0.89	
4	4.69	0.82	0.63	0.92	

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$; DMS: diferencia mínima significativa.



Figura 20. Clon Hgo 5, enraizamiento bajo diferentes concentraciones de sacarosa

En este experimento se corrobora que para el enraizamiento de explantes de cosmos es necesario agregar sacarosa como menciona Margara, (1988) y,

ambos clones mostraron la misma tendencia a la sacarosa, aunque el clon cultivado Kew, desarrolló mayor número de raíces pero de menor longitud comparado con el clon Hgo 5, en el que se obtuvo menor número de raíces pero de mayor longitud, es decir el clon silvestre muestra mejor desarrollo de raíces con la misma concentración de sacarosa, en ambos clones se observó que por arriba del 3 % de sacarosa hubo disminución del tamaño de raíces y del brote esto posiblemente porque el potencial osmótico del medio aumentó e impidió que el explante pudiera absorber adecuadamente los nutrimentos del medio, por lo que tanto para el crecimiento de raíces como el brote se vio limitado tal como menciona Ertola *et al.* (1994). Una ventaja que presentaría al tener un brote más corto con el 6 % de sacarosa es que el brote no se enrolla en el tubo y al momento de aclimatarse no se tendría que tutorar porque el brote se mantendría erecto por sí solo.

4.5.3 Efecto del fotoperiodo en el enraizamiento

En la respuesta al fotoperiodo en el clon Kew, el número de raíces con 14 y 16 horas de luz fue mejor con más de 10 raíces por explante, a diferencia de los tratamientos con 8, 10, y 12 horas, donde ningún tratamiento alcanzó las 7 raíces por explante, la longitud de las raíces fue ligeramente superior en los tratamientos con 14 y 16 horas luz, aunque estadísticamente no hubo diferencias con los tratamientos de 8 y 12 horas luz, en la longitud del brote se vio una tendencia a disminuir conforme aumentó la duración del fotoperiodo, el de mayor longitud de brote fue a 8 horas de luz con 15.1 cm y que posiblemente a la falta de luz tendió a alargarse más el brote. Los mejores resultados en vigor fue con 16 y 14 horas luz (Cuadro 14) (Figura 21).

Cuadro 14. Clon Kew y su respuesta al fotoperiodo en el enraizamiento

Fotoperiodo (horas luz)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Longitud del brote (cm)	Número de nudos por brote	Vigor del brote
8	5.4 b ^z	1.3 ab	15.1 a	7.2 a	60 % bajo, 40 % medio
10	6.0 b	1.1 b	12.2 ab	6.4 a	60 % bajo, 40 % medio
12	6.2 b	1.5 ab	12.7 ab	6.6 a	33.3 % bajo, 66.7 % medio
14	10.8 a	1.9 ab	12.0 b	6.6 a	16.6 % bajo, 50 % medio, 33.4 % alto
16	11.1 a	2.4 a	7.8 c	6.0 a	100 % alto
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	4.1	1.10	2.70	1.23	
3	4.2	1.15	2.84	1.29	
4	4.3	1.19	2.92	1.33	
5	4.4	1.21	2.98	1.36	

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$; DMS: diferencia mínima significativa.



Figura 21. Enraizamiento bajo diferentes fotoperiodos

La respuesta del clon Hgo 5 al fotoperiodo fue mejor con 16 horas luz, aunque con 8 horas luz también fue estadísticamente igual pero las raíces que presentaban fueron muy delgadas, la longitud de raíces también fue estadísticamente superior a 16 horas, la longitud del brote también fue menor conforme aumentó el fotoperiodo, el vigor fue mejor con 12, 14 y 16 horas luz (Cuadro 15) (Figura 21).

Cuadro 15. Clon Hgo 5 y su respuesta a fotoperiodo en el enraizamiento

Fotoperiodo (horas luz)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Longitud del brote (cm)	Número de nudos por brote	Vigor del brote
8	12.1 ab ^z	3.1 b	12.5 a	10.2 a	57.1 % medio, 42.9 % alto
12	6.8 b	4.6 ab	11.5 a	9.3 a	100 % alto
14	6.1 b	2.5 b	8.5 b	8.8 a	16.6 % medio, 83.4 % alto
16	14.4 a	5.8 a	8.0 b	10.4 a	100 % alto
(DMS) Número de medias		Rango crítico			
2	6.70	2.05	2.11	1.54	
3	7.04	2.15	2.21	1.62	
4	7.25	2.22	2.28	1.67	

^z Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan con $p \leq 0.05$.; DMS: diferencia mínima significativa.

La respuesta a fotoperiodo parece ser mejor a fotoperiodos largos (14 y 16 horas), sin embargo, no hay una diferencia clara en el número de raíces y su longitud, la longitud del brote fue mayor con los fotoperiodos de 8 horas en ambos clones y esto podría ser una respuesta debido a la falta de luz por lo que el brote tiende a alargarse, contrario a la respuesta con fotoperiodo de 16 horas donde el brote fue de menor crecimiento y mayor vigor (Cuadro 14 y 15), en esta etapa parece mostrar resultados contrarios a los obtenidos en plantas *ex vitro* en el trabajo de Kanellos y Pearson (2000), que mejores respuesta morfológicas se obtuvieron a fotoperiodos de 17 horas luz.

4.6 Conclusiones

El floriglucinol en concentraciones iguales o superiores a 25 mg L⁻¹ funcionó como un cofactor positivo en el enraizamiento *in vitro* de explantes de clones silvestres de cosmos chocolate, duplicando el número de raíces.

La sacarosa en concentraciones superiores a 3 % reduce hasta en un 40 % la longitud de raíces y de brotes *in vitro* de clones silvestres de *Cosmos atrosanguineus*.

El fotoperiodo de 16 horas usado comúnmente fue mejor en la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Cosmos atrosanguineus*.

4.7 Literatura citada

- Cervantes, V., Olguín, P., Ortega P., López A. L., V. Chávez A., Y Bye R. 1999. Micropropagación y establecimiento ex vitro de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss, especie extinta en la naturaleza. Tercer encuentro sobre el conocimiento de las dalias en México. *Amaranto* 10:1-9
- Fay, M. F., & Hind, N. (2003). *Cosmos atrosanguineus* Compositae. *Curtis's Botanical Magazine*, 20(1), 40-48.
- Gómez, P. D., y Morales V. B. (2015). Inducción *In vitro* de raíces tuberosas de cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, 71: 40-61.
- Kanellos, E., & Pearson, S. (2000). Environmental regulation of flowering and growth of *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) Voss. *Scientia Horticulturae*, 265-274.
- Lorenzo, I. A. (2006). Enraizamiento *in vitro* y desarrollo *in vivo* de cosmos (*cosmos atrosanguineus* Sherff.). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, 53: 29-45.
- 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.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.

- 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. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 323-327.
- Ortega-Larrocea, M., Chávez, M., & Bye Boettler, R. (1997). Micropropagación y establecimiento ex vitro de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranto*, 10, 1-9.
- Rodriguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del Género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 610-619.
- UPOV. (2015). *International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV)*. Recuperado el 20 de Octubre de 2015, de Database Plant Variety: <http://www.upov.int>
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. (2003). Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann Bot.*, 91(1), 65-74.