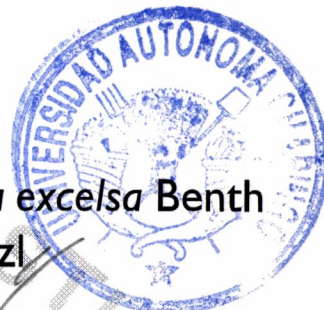


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**REGENERACIÓN *in vitro* DE *Dahlia excelsa* Benth
Y *Dahlia imperialis* Roezl**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
VICERRECTORIA DE SERVICIOS PROFESIONALES

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

PRESENTA

SAMUEL GONZÁLEZ ALCALDE

913141

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 1999



HORTICULTURA
posgrado
universidad autónoma chapingo

Regeneración *in vitro* en *Dahlia excelsa*, Benth y *Dahlia imperialis*, Roezl.

La presente tesis fue realizada por **Samuel González Alcalde**, bajo el Comité Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR

Director


M. C. José M. Mejía Muñoz

Asesor


Dr. Hector González Rosas

Asesor


M.C. Alejandro Manzo González

34351

REGENERACIÓN *in vitro* EN *Dahlia excelsa*, Benth Y *Dahlia imperialis*, Roezl.

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Samuel González Alcalde** autor de la presente tesis, de Maestría en Ciencias en Horticultura estuvo constituida por:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR

Presidente



M. C. José M. Mejía Muñoz

Asesor



Dr. Hector González Rosas

Asesor



M.C. Alejandro Manzo González

DEDICATORIA

A mis padres, quienes además de darme la vida, me educaron e influyeron en mi, amor hacia los conocimientos nuevos.

Marcelina Alcalde Villada.

Enrique González López.

A mi hijo: Gerardo González Castillo, razón del esfuerzo por culminar este trabajo.

A mi compañera: Rosalba Castillo Almeraya, por darme la alegría de ser padre.

A todos y cada uno de mis hermanos y hermanas: amigos incondicionales, de quienes siempre he recibido todo tipo de apoyos.

A mis compañeros y amigos de Horticultura, en especial a Isaías Ucan C., Eusebio Bernabe C., Mario Moreno M., Lauro Martínez M. y Vicente Mendoza de Jesus, por los momentos de amistad y grata convivencia.

A Ramona Pérez L. y a Rosa María Ibarra C. por la amistad y momentos de alegría compartidos en esta etapa de la vida.

A todos y a cada uno de las personas que apoyaron de alguna forma la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTO

Al CONACYT, por el apoyo económico brindado, sin el cual sería difícil la culminación de esta etapa académica.

A la Universidad Autónoma de Chapingo, Alma Mater, por la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos

Al programa de Maestría en Horticultura y sus profesores por otorgarme la oportunidad y apoyos de conocer y desarrollarme en el área hortícola.

Al M. C. Jose M. Mejía Muñoz, por la conducción y apoyo en la realización de este trabajo.

A los profesores asesores, Dr. Hector González Rosas y M. C. Alejandro Manzo González, por las sugerencias y apoyo proporcionado en la realización de la presente tesis.

A la Dra. Alva Jofre y Garfias, por las facilidades otorgadas para la realización de la inoculación bacteriana, en el CITESTAV-Trapunto.

A todas las personas que de alguna manera apoyaron en la realización de este trabajo, gracias...

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor es originario del Estado de México; ingresó a la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) en 1987 y concluyó la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología en 1994. La tesis de Licenciatura sobre certificación de material de importación de esquejes de geranio (*Pelargonium* spp), ha laborado en la Oficina de Transferencia de Tecnología y Estudios Especiales del Colegio de Postgraduado en 1996 y en la Secretaría de Desarrollo Agropecuario en 1997.

En Enero de 1997 ingresó a la Maestría en Ciencias en Horticultura del Departamento de Fitotecnia en la UACH, concluyendo en Diciembre de 1998 con la realización del trabajo de tesis en aspectos de cultivo de tejido de dalias arborescentes.

RESUMEN

REGENERACIÓN *in vitro* DE *Dahlia imperialis*, Roezl Y *Dahlia excelsa*, Benth.

Samuel González Alcalde. Maestría en Ciencias en Horticultura.

(Bajo la dirección del M.C. Jose Merced Mejía Muñoz)

El objetivo de este trabajo fue el de establecer un sistema de regeneración *in vitro* de *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*, así como probar los efectos de la inoculación con *Agrobacterium tumefaciens* sobre la planta. Se utilizaron plantas adultas en crecimiento vegetativo y como fuente de explante; hojas, tallo, peciolo, ápices, yemas apicales, botones florales y flores liguladas. Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), adicionado con diferentes compuestos y reguladores de crecimiento, según los objetivos de cada experimento. Se observó que las plantas provenientes de campo presentaron una fuerte contaminación sistémica, principalmente de bacterias y una gran susceptibilidad a deshidratación. Asimismo se presentó una fuerte oxidación en todos los tejidos, siendo menor en tallos y los antioxidantes que mejor controlan fueron: ácido cítrico 150 mg·l⁻¹, ácido ascórbico 150 mg·l⁻¹ y l-cisteína 100 mg·l⁻¹.

Los explantes que favorecieron la formación de callo fueron el tallo y hoja provenientes de plantas en estado vegetativo en un medio de cultivo suplementado con benciladenina (BA) de 0.1 a 3.0 mg·l⁻¹; la interacción con AIB no se obtuvo efecto organogénico. En yemas la presencia de ANA favoreció la

formación de callo en la base de éstas, mientras que AG3 +sulfato de adenina provocó la brotación y crecimiento de yemas en ambas especies. En callos ninguno de los tratamientos empleados se obtuvo regeneración de brotes. La presencia de AIA en concentraciones de 0.5 a 1.0 mg/l-1, provocó los mejores efectos de enraizamiento. Las plantas obtenidas se transfirieron al invernadero sin ningún problema y después de cuatro semana se pasaron a campo. El efecto por la inoculación de *A. tumefaciens* en hojas fue un abundante enraizamiento, pero sin la formación de callo.

PALABRAS CLAVES: Cultivo de tejido, clonacion, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

S. González A.

REGENERATION *in vitro* OF *Dahlia imperialis*, Roezl AND *Dahlia excelsa*, Benth.

(Under the direction of J. M. Mejía M)

The objective of this work was to establish an *in vitro* regeneration system of *Dahlia excelsa* and *Dahlia imperialis*, as well as to prove the effects of the inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* on mature and vegetal plants were the source of explants of leaf, stem, petiole, shoot tips, axillary buds, floral buds and lily-like flowers. It was observed that the originating plants growing in the field presented a strong contamination of systemic type, mainly of bacteria and a great susceptibility to dehydration. Also a strong oxidation in all explants appeared, being lower in stems and petioles and higher in shoot tips, axillary buds, floral buds, lily-like flowers and leaf, the antioxidant ones that controlled better were: citric acid 150 mg·l⁻¹, ascorbic acid 150 mg·l⁻¹ and l-cysteine 100 mg·l⁻¹.

The explants that favored the formation of callus were stem and leaf of plants in vegetative state in a medium supplemented with benzyladenine (BA) of 0.1 to 3.0 mg·l⁻¹, the interaction with IBA did not obtain organogenic effect. In lateral buds NAA favored the formation of callus in the base, whereas adenine sulphate + GA₃ caused the sprouting and growth of lateral buds in both species. None of the treatments generated regeneration shoots. The presence of

IAA 1.0 to 0,5 mg l⁻¹, caused the best effects of rooting. The obtained plants transfered to the greenhouse without problem and after of four weeks went to field. The effect inoculation with *A. tumefaciens* in leaves was an abundant rooting, but without the callus formation.

KEY WORDS: Tissue culture, clonation, regulators of growth.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

INDICCE DE CUADROS..... xv

ÍNDICE DE FIGURAS..... xvii

1 INTRODUCCIÓN..... 1

2 REVISIÓN DE LITERATURA..... 3

2.1. Origen..... 3

2.2. Importancia..... 4

2.3. Características 6

2.3.1. Clasificación taxonómica..... 6

2.3.2. Citología..... 7

2.3.3. Tipos de dalias..... 7

2.4. Propagación..... 9

2.4.1. Tubérculos..... 10

2.4.1. Semilla..... 11

2.4.1. Esqueje..... 12

2.5. Plagas y enfermedades..... 12

2.6. Mejoramiento..... 14

2.7. Reguladores de crecimiento..... 14

2.7.1. Giberelinas..... 15

2.7.2. Auxinas..... 16

2.7.3. Citocininas..... 17

2.8. Procesos morfogénicos..... 18

2.8.1. Totipotencia y clonación.....	18
2.8.2. Organogénesis.....	19
2.8.3. Embriogénesis somática.....	19
2.9. Cultivo <i>in vitro</i>	20
2.9.1. Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	20
2.9.1.1. Fase I. Establecimiento de un cultivo aséptico.....	21
2.9.1.1.1. Oxidación.....	21
2.9.1.2. Fase II: Multiplicación del propágulo.....	22
2.9.1.3. Fase III: Preparación para restablecimiento de la planta a suelo.....	23
2.9.2. Medio de cultivo.....	23
2.9.3. Luz.....	25
2.9.3.1. Intensidad de luz.....	25
2.9.3.2. Periodo de luz.....	25
2.9.3.3. Calidad de la luz.....	26
2.9.4. Temperatura.....	27
2.10. Cultivo <i>in vitro</i> de dalias.....	27
2.10.1. Metodologías.....	28
2.11. Transformación genética.....	30
2.11.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
2.10.2. Método de Horsch <i>et al.</i>	32
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. Lugar donde se realizó la investigación.....	34
3.2. Material vegetal	34
3.3. Establecimiento del sistema de regeneración.....	35
3.3.1. Manejo del material.....	36
3.3.2. Desinfección del material.....	36
3.3.3. Evaluaciones.....	38
3.3.3.1. Prueba de explantes.....	38

3.3.3.2. Prueba de antioxidantes.....	39
3.3.3.3. Pruebas de citocininas.....	41
3.3.3.4. Prueba con estructuras florales.....	42
3.3.3.5. Pruebas de hojas en diferentes etapas de desarrollo.....	43
3.3.3.6. Incremento del nivel de antioxidantes y disminución del tiempo de desinfección.....	44
3.3.3.7. Efecto del BA y AIB.....	46
3.3.3.8. Pruebas de AG ₃ y sulfato de adenina.....	47
3.3.3.9. Tratamiento para enraizamiento.....	49
3.4. Aplicación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
3.4.1. Cepa bacteriana.....	51
3.4.2. Preparación del medio para la cepa de <i>A. tumefaciens</i>	51
3.4.3. Inoculaciones <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	52
3.4.4. Siembra y efecto de <i>A. tumefaciens</i>	53
 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 54
4.1. Observaciones generales.....	54
4.2. Prueba de explantes.....	54
4.3. Prueba de antioxidantes.....	58
4.3.1. Concentraciones de carbón activado y sales del medio.....	62
4.4. Prueba de citocininas.....	65
4.5. Prueba con estructuras florales.....	68
4.6. Incremento del nivel de antioxidantes y disminución del tiempo de desinfección.....	71
4.7. Pruebas en hojas de diferentes etapas de desarrollo.....	74
4.8. Efecto de AIB y BA.....	76
4.9. Pruebas de AG ₃ y sulfato de adenina.....	79

4.10. Tratamiento para enraizamiento.....	82
4.11. Efecto de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
5. CONCLUSIONES.....	91
6. BIBLIOGRAFÍA.....	93

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Combinaciones del factor A y B, para determinar el efecto de los métodos de control de oxidación y los tipos de explantes sobre la oxidación, en <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	40
Cuadro 2.	Combinaciones, de las técnicas para reducir la presencia de oxidación y los tipos de tejidos en <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	40
Cuadro 3.	Tratamientos para determinar el efecto de citocininas en tallos y hojas de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	41
Cuadro 4.	Tratamientos para determinar la presencia de desdiferenciación en estructuras florales y efecto de agentes antioxidativos en <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	43
Cuadro 5.	Tratamientos evaluados para conocer la influencia del nivel de desarrollo para la desdiferenciación y oxidación en hojas de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	44
Cuadro 6.	Tratamientos para evaluar altos niveles de antioxidantes en yemas y hojas de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	45
Cuadro 7.	Tratamientos para determinar el efecto de citocininas (BA) y auxinas (AIB), en yemas y callos de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	46
Cuadro 8.	Tratamientos para evaluar la influencia de AG ₃ y sulfato de adenina sobre la organogénesis en callos de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1989.....	47
Cuadro 9.	Influencia de sulfato de adenina y AG ₃ , sobre el crecimiento de yemas laterales de <i>Dahlia imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	48
Cuadro 10.	Tratamientos para inducir enraizamiento en brotes de <i>Dahlia</i>	

	<i>imperialis</i> y <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	49
Cuadro 11.	Actividades realizadas para evaluar el efecto de la cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> en tejido de dalias arborescentes CINVESTAV-Irapuato, Méx. 1998.....	50
Cuadro 12.	Medio de cultivo específico YEB (Yeast Extract B) para <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . CINVESTAV-Irapuato, Gto. 1989.....	51
Cuadro 13.	Medias de oxidación en los diferentes tratamientos evaluados en <i>Dahlia imperialis</i> Chapingo, Méx. 1997.....	63
Cuadro 14.	Medias de oxidación oxidación en los diferentes explantes evaluados <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	63
Cuadro 15.	Interacción BA, AIB y sales del medio MS sobre crecimiento de callo originados de hojas en <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1998.....	77
Cuadro 16.	Efecto de la concentración de AIB y sales del medio MS sobre crecimiento de yemas laterales. de dalia Chapingo, Méx. 1998.	79
Cuadro 17.	Efecto de AG ₃ y sulfato de adenina sobre el crecimiento de yemas laterales de <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo. Méx. 1998.....	80
Cuadro 18.	Efecto de AG ₃ y Sulfato de adenina sobre organogénesis en <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo. Méx. 1998.....	81
Cuadro 19.	Respuesta promedio de brotes en <i>Dahlia imperialis</i> , a diferentes tratamientos para enraizar. Chapingo, Méx. 1998.....	84
Cuadro 20.	Respuesta promedio de brotes de <i>Dahlia excelsa</i> , a diferentes tratamientos para enraizar, Chapingo, Méx. 1998.....	84
Cuadro 21.	Efecto de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sobre la inducción de raíces, formación de callo e incidencia de oxidación, en cotiledones de <i>Dahlia imperialis</i> a 28 días de inoculado, CINVESTAV-Irapuato, 1998.....	88
Cuadro 22.	Efecto de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sobre la inducción de raíces, formación de callo e incidencia de oxidación, en hojas verdaderas de plántulas de <i>Dahlia imperialis</i> a 20 días de inoculado, CINVESTAV-Irapuato, 1998.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Actividades desarrolladas para establecer el sistema de regeneración en <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx.1997-98.....	37
Figura 2.	Presencia de oxidación en diferentes explantes de <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	57
Figura 3.	Presencia de oxidación en diferentes explantes de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	57
Figura 4.	Promedio de las oxidaciones presentadas en los explantes evaluados en <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997. Escala de medición establecida 0= < 10%, 1= ≥10 < 30%, 2= ≥30 <60%, 3= ≥60 <90% y 4= ≥90%. Chapingo, Méx. 1997.....	60
Figura 5.	Promedio de las oxidaciones presentadas en los explantes evaluados en <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. Escala de medición establecida 0= < 10%, 1= ≥10 < 30%, 2= ≥30 <60%, 3= ≥60 <90% y 4= ≥90%. Chapingo, Méx. 1997.....	61
Figura 6.	Medias de la oxidación en los tipos de explantes de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	64
Figura 7.	Promedio del efecto de citocininas evaluada en hojas de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997. Escala arbitraria establecida para la medición de formación de callo en hojas; 1= nula, 2= pequeña, 3= mediana y 4= grande.....	66
Figura 8.	Promedio del efecto de citocininas evaluadas en tallo de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997. Escala arbitraria para medición de crecimiento de callo en tallo; 0= nulo, 1= poco, 2= mediano, 3= grande y 4= muy grande.....	67
Figura 9.	Efecto de los diferentes concentraciones de BA sobre la formación de callo en hoja de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	67
Figura 10.	Progreso de la oxidación en lígulas y tubulígulas en <i>Dahlia excelsa</i> . Chapingo, Méx. 1997.....	70

Figura 11.	Progreso de la oxidación en lígulas de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, M�x. 1997.....	71
Figura 12.	Influencia de antioxidantes en un medio MS y disminución del tiempo de exposición al desinfectante en hojas y yemas laterales en <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> sobre el porcentajes de oxidación. Chapingo, M�x. 1998.....	73
Figura 13.	Efecto de la etapa de desarrollo, antioxidantes y carbón activado en hojas de <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> sobre el promedio del nivel de oxidación. Chapingo, M�x. 1998. Escala de medición del grado de severidad de la oxidación, en base al porcentaje de tejido oxidado 1=0-30%, 2=30-60%, 3=60-90% y 4=>90%.....	74
Figura 14.	Efecto de la etapa de desarrollo sobre la inducción de callo en hojas de <i>Dahlia excelsa</i> y <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, M�x. 1998. Escala para medir crecimiento; 1= nula, 2=medio y 3=grande....	76
Figura 15	Efecto de AG ₃ + sulfato de adenina, en un medio MS suplementado con 3.0 mg�l ⁻¹ de BA + 0.1 mg�l ⁻¹ de ANA en <i>Dalia imperialis</i> . Cahpingo, M�x. 1998.....	80
Figura 16.	Efecto de la aplicación de AIA sobre enraizamiento de brotes subcultivados de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, M�x. 1998.....	85
Figura 17.	Efecto de AIA sobre enraizamiento de brotes subcultivados de <i>Dahlia imperialis</i> . Chapingo, M�x. 1998.....	86

1 INTRODUCCIÓN

El género *Dahlia* es originario de México y parte de Centroamérica. En el siglo XVI, los españoles lo mencionaron como una especie utilizada por los aztecas para transportar agua y conocido como “acocotli” o agua-bastón (Killingsworth, 1996). Actualmente es conocida a nivel mundial, con amplia variabilidad en colores y formas, producto de hibridaciones. Sin embargo de las 27 especies de este género sólo 4 ó 5 constituyen la base genética de las dalias cultivadas; por lo que las posibilidades de introducción de nuevas características genéticas a esta planta, queda abierta en función del mayor conocimiento y domesticación del resto de las especies de dalia (Hammet, 1980).

Para el mejoramiento genético y caracterización de especies ornamentales se utiliza actualmente el método *in vitro* en un medio nutritivo y condiciones estériles (Pierik, 1994). La regeneración *in vitro* es una técnica muy importante y bastante utilizada para observar la expresión de genes extraños introducidos por *Agrobacterium* y/o biobalística para mejorar algunas características como el color de la flor, tal es el caso de la introducción de una copia adicional del gen de la chalcona sintetasa (CHS) en petunia, lo cual produjo una gama de colores en las flores de diversas plantas generadas a partir de esta introducción (Robinson y Firoozabady, 1993; Elomaa y Holton, 1994).

La producción de plantas morfológicamente normales que contengan y expresen los genes introducidos ha sido posible por el uso de un vehículo natural que transfiere los genes como es *Agrobacterium tumefaciens*. Dentro de

la cadena de ADN de esta bacteria, en la zona Ti ha sido removido y reemplazado con genes quiméricos para inducir a una resistencia a los antibióticos, lo que permite lograr una expresión de los genes modificados (Horsch *et al.*, 1985).

Sin embargo se requieren más estudios sobre cultivo *in vitro* en tejidos de dalias, para poder establecer en definitiva un sistema de regeneración por micropropagación ya que no se cuenta de tal sistema de cultivo *in vitro* que garantice una respuesta uniforme y favorable para la obtención de plantas en un mismo genotipo y esto es más notorio en especies silvestres, en este caso las arborescentes.

Da acuerdo a las consideraciones expuestas en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*.
 - Establecer que explante es el más adecuado para una propagación masiva de las especies tratadas.
 - Encontrar el medio adecuado para formar organogénesis de los callo
- 2 Realizar inoculación de *Agrobacterium tumefaciens* en hojas, para conocer su efectividad como vehículo de inserción de genes.

Hipótesis:

1. Es posible obtener plantas completas mediante la utilización de cualquier explante, y obtener organogénesis de callos formados.
2. Existe al menos una cepa de *Agrobacterium* que infecta eficientemente tejidos de dalia arborescentes.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

El género *Dahlia* es originario de la región desde Guatemala hasta la parte central de México, principalmente de zonas montañosas. En el siglo XVI, los españoles lo mencionaron como una especie utilizada por los aztecas para transportar agua y conocido como “acocotli” o agua-bastón (Killingsworth, 1996). También se registra con el nombre nahualt “acocoxochitl” (De la Peña, 1995). Heillenman (1995) mencionó que los aztecas fueron los primeros en domesticarlo y llegaron a utilizarlo como alimento, aunque se sabe que el tubérculo tiene un sabor amargo, además no se señala la manera de preparación. Aird (1997) mencionó que los aztecas lo conocían como “acocotli y chichipatl” y era utilizado como ornamental, medicinal para transporte de agua y como alimento.

Los españoles la introdujeron a Europa en 1700, inicialmente en los jardines botánicos de Madrid, España. A inicios del siglo XVIII, señalan las primeras flores dobles, sin embargo a partir de 1810 a 1840 se fueron ampliando las combinaciones de colores, formas y tamaño (Killingsworth, 1996). Algunos autores indican que en 1784, Don Vicente Cervantes, Director del Jardín Botánico de México, envió algunas semillas al Abate Cavanilles, que fungía como Director de los Jardines de Madrid, Cavanilles les designó el nombre de dalia en honor del botánico Sueco Andrés Dahl (De la Peña, 1995).

El desconocimiento de su cultivo en Europa indujo a los cultivadores a cuidar las dalias en estufas e invernaderos, fracasando en ciudades como Berlín, Londres y París y no fue hasta el año de 1808 que se inicia su cultivo al aire libre en Inglaterra por orden de Wedgwood y su clasificación como planta ornamental en Lovaina, Bélgica en 1824 (De la Peña, 1995).

En 1872, un corresponsal mexicano envió a un horticultor holandés Van Der Berg una caja conteniendo diversas semillas de cebolla y bulbosas, de entre todas las semillas se distinguía una dalia doble de la cual sus pétalos terminaban en punta, muy parecida a los de una flor de cactus, por tal motivó las cultivó profusamente, tomando popularidad de inmediato. Este horticultor quiso rendir homenaje al país de origen, dándole el nombre de *Dahlia juarezii* en estima a Benito Juárez, el cual en fecha reciente había expulsado al ejercito francés (De la Peña, 1995).

Aird (1997) señala que Cavanilles sembró especies originales de los actuales especies de *D. pinata*, *D. rosea* y *D. coccinea*. Además indica que *D. coccinea* es uno de los originarios de las flores simples, en tanto que *D. pinata* y *D. rosea* produjeron colores rojo, escarlata, violeta y morado.

2.2. Importancia

De las especies que México ha aportado al mundo, la dalia (*Dahlia* spp.) es sin duda una de las más populares, debido a la diversidad de formas, colores y un amplio uso en la horticultura ornamental. De las 27 especies del género *Dahlia* sólo 4 ó 5 constituyen la base genética de las dalias cultivadas; por lo que las posibilidades de introducción de nuevas características genéticas a esta planta, queda abierta en función del mayor conocimiento y domesticación del resto de las especies de dalia (Hammet, 1980). Sin embargo, Mejía *et al.* (1995)

mencionaron que este género está formado por 30 especies endémicas de México, sin embargo no se sabe con precisión el valor agronómico que tienen las especies de este género, ni la posibilidad de recombinaciones genéticas.

Actualmente se ha extendido por todos el mundo, así podemos encontrarlo en países tan remotos como Nueva Zelanda, Rusia, la India y Japón. Particularmente en los países europeos como Holanda, Bélgica, Francia y de algunas otras regiones, donde se dedican grandes recursos económicos para la obtención de nuevas variedades que se incrementan en un promedio de 200 por año. En México, el interés actual no refleja la importancia histórica de la dalia, no obstante que en fecha reciente se proclamó como la Flor Nacional por el Presidente Adolfo López Mateos, por decreto presidencial del 25 de abril de 1963, por sugerencia de Instituciones oficiales y particulares, como la Sociedad Botánica de México, el Periódico Excelsior y La Unión Nacional de Floricultores y Viveristas (De la Peña, 1995).

Heillenman (1995) mencionó que a nivel mundial existen aproximadamente 40,000 nombres cultivares de dalias. En Francia la dalia cultivada ocupa el cuarto lugar dentro de las bulbosas, con más de 400 cultivares, sin embargo se dificulta su comercialización por el sistema de propagación más utilizada, que es por bulbos (Wang *et al.*, 1988).

Aird (1997) señaló que el tubérculo tiene un sabor amargo, maloliente y penetrante, sin embargo una vez ingerido alivia dolores de estomago, elimina las flatulencias del estomago, estimula el sistema urinario, ayuda a eliminar el azúcar de la sangre; por ser una fuente de fructosa para los diabéticos, saca el frío del estomago, induce resistencia a cólicos, abre obstrucciones y reduce tumores.

La dalia como flor de corte es poco importante, ya que se han obtenido pocos cultivares específicos para este fin, principalmente porque tiene un periodo muy corto de vida de florero, Heillenman (1995) menciona que el valor como flor de corte es mediante un tutoreo, sin embargo en flores grandes no representa una solución. En *D. excelsa* la flor completa, dura en florero bajo sombra de 6-8 días, los primeros síntomas es marchitez de la inflorescencia y caída de las flores.

Aird (1997) mencionó que en 1804 Humbolt y Bonplant llevaron semillas del Sur de México y Centro América a Europa, esta semillas crecieron en el Jardín Botánico de Hamburgo, de esta colección se reportaron los primeros híbridos, además indicaron que el color crema y amarillo al parecer iniciaron las flores híbridas. Desde entonces ninguna especie silvestre nueva ha sido explotada, para la obtención de nuevas variedades.

2.3. Características

2.3.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo a Sorensen (1969) y Hammet (1980) la clasificación taxonómica del género *Dahlia* es la siguiente:

Reino: Vegetal

Subreino: Cormofita

División: Embryophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

subclase: Simpetala

Orden: Campanulales

Familia: Asteraceae (Compositae)

Tribu: Heliantheae

Subtribu: Coriopsidinae

Género: *Dahlia*.

Las especies consideradas son; *Dahlia imperialis* (merckii) y *Dahlia excelsa*.

Sinonimia son: dalia arborescente campanilla, árbol candelabro y dalia arborescente. Es una planta perenne, color de la flor es blanco, morado y lavanda, florece en otoño, de 2 a 3.5 metros de altura (Fell, 1995); el mismo autor indicó que el tallo es parecido al bambú y las cabezuelas florales crecen de 4 a 7 pulgadas de ancho. Bajo condiciones ideales puede crecer hasta 7 metros, sin embargo se sabe que las dalias crecidas de semillas no son tan grandes. Estrada (1996) mencionó que *D. imperialis* puede alcanzar una altura de 5 metros.

A nivel mundial no es conocido la especie *D. excelsa*, además ocasionalmente se confunde como especie igual a *D. imperialis*, ya que en todos los trabajos son referidos a *D. imperialis*, y corresponden a esta especie, porque no indican que exista variaciones en los tipos de flores, como es típico en la especie *D. excelsa*, como lo mencionó Arcos *et al.* (1994), los cuales determinaron que esta especie presenta capítulos sencillos, intermedios y dobles.

2.3.2. Citología

Gorer, citado por Hernández *et al.* (1994), mencionó que las especies progenitoras de las dalias cultivadas tenían 32 cromosomas y estas fueron diploides con número haploide igual a 16. Sin embargo cuando se estudió el comportamiento meiótico de los cromosomas se encontró que todas las especies son tetraploides y originalmente debió de haber existido una especie antecesora de dalia con 8 cromosoma.

2.3.3. Tipos de dalias

Killingsworth (1996) mencionó que La Sociedad Americana de la Dalia, clasifica a las dalias en varios grupos basándose en talla, forma y color de la

flor. Para los tallas; tenemos a gigante (Aa) de mas de 25 cm, grande (A) de 20.3 - 25 cm, media (B) de 15.2 - 20.2 cm, pequeña (BB) de 10.1 - 15.1 cm, miniatura (M) de 10.00 cm, bola (BA) de 8.8 cm, bola miniatura (Mb) de 5.5 - 8.8 cm, pompon (P) 5.2 cm, mignon solo (MS) hasta 5 cm de diámetro

Killingsworth (1996) señaló una clasificación con base a la forma de la forma de la flor y arreglo de pétalos, de la siguiente manera: **Simples** cada flor tiene ocho a diez pétalos circundante y un disco central, **anémona** flores dobles con una o más hileras de pétalos planos circundantes y un denso grupo de pétalos tubulares más largos que en el disco en las flores simples, **collarete** flor simple con ocho a diez pétalo externos, con un pequeño collar de pequeños pétalos bordeando por afuera del disco central, **agua-lili** flor grande doble generalmente los pétalos angosto en las puntas, los cuales son planos o ligeramente encorvados en los márgenes, la distribución de la flor da la apariencia plana, **decorativa** flor ancha y doble con pétalos planos que curvean ligeramente los márgenes hacia el tallo, **bola** aplanado o esférico, flor doble completamente con pétalos casi tubulares, **pompon** aplanados o esféricos, flor doble con más de cinco cm de ancho - una forma de bola miniatura, **cactus** flor doble angosto los pétalos puntiagudos pueden ser rectos o encrespados hacia adentro y tener un doblamiento en los bordes de los pétalos por más de las dos terceras parte de su longitud, **semicactus** son flores dobles similares a cactus pero con la base amplia en los pétalos y los bordes doblados en la parte de la punta, **misceláneos** flores con una amplitud rango de tipos no clasificados, incluyendo tipo orquídeas, formas dobles o simples y fibrilados. Existen otras clasificaciones, las cuales son variantes de la clasificación anterior.

Killingsworth (1996) señaló que la Sociedad Americana clasifica en quince colores o combinaciones; blanco, amarillo, naranja, rosa, rosa oscura, rojo, rojo oscuro, lavanda, morado, pastel, bronce, color fuego, combinaciones

oscuras, colores jaspeados y bicolors, sin embargo no se reporta el color azul, ni tonalidades azuladas, como en otras especies florícolas se esta buscando.

2.4. Propagación

Las dalias pueden perpetuarse mediante semilla, enraizamiento de esqueje o el más utilizado, mediante tubérculos (Evans, 1998). Wang *et al.* (1988); Hernández y Mejía (1994) reportaron que se han obtenido por micropropagación partiendo de yemas laterales y de botones florales. Evans, (1998) mencionó que las dalias comerciales entran en reposo durante los meses invernales. Se observó en campo que bajo condiciones adecuadas de temperatura *D. excelsa*, puede inducir la brotación en invierno en aproximadamente dos semanas, por lo que la influencia de las reservas son determinantes para la regeneración de nuevos brotes, lo que implica que para esta especie no es necesario un reposo invernal. Para *D. imperialis* esta puede permanecer viva durante todo el año, debido al engrosamiento de la base del tallo, en donde se acumulan las reservas y de donde surgen los brotes cuando las condiciones de humedad y temperaturas sean adecuadas, sin embargo no necesariamente requiere de periodo de reposo para brotación, esto es por tener un origen de clima cálido.

Se deben sembrar en un lugar soleado, suelo con buen drenaje para evitar encharcamientos y un pH de alrededor de 6.5, la separación entre plantas varía dependiendo de la talla de la especie (Kerrigan, 1992).

Como toda planta ornamental, requiere de un suelo rico en nutrimentos, en caso de fertilización requiere de una dosis baja en nitrógeno como 5 - 20 - 20, aplicando al inicio del ciclo y no al final, de hecho en el Estado de Ohio no se debe aplicar después de agosto (Kerrigan, 1992).

Un manejo de formación en las dalias es el pinchado cuando se tienen de 3 a 4 pulgadas de la yema terminal justo arriba del segundo par de hojas, con esto produce dos tallos principales (Kerrigan, 1992).

Las dalias pueden perpetuarse mediante semilla, enraizamiento de esqueje o el más utilizado, mediante tubérculos. Evans (1998) menciona que las dalias comerciales entran en dormancia durante los meses invernales. Se observó en campo que bajo condiciones adecuadas de temperatura *D. excelsa*, puede inducir la brotación en invierno en aproximadamente dos semanas, por lo que la influencia de las reservas son determinantes para la regeneración de nuevos brotes, lo que implica que para esta especie no es necesario un reposo invernal.

2.4.1. Tubérculos

Aird (1997) mencionó que no necesariamente el tamaño de un tubérculo corresponde un crecimiento proporcional de la planta, además los tubérculos pequeños son más fáciles de almacenar. Las plantas originadas de estacas usualmente forman tubérculos con proporción baja de “ojos” o “yemas”.

Para la extracción de los tuberculo, Aird (1997) mencionó que deben tener un “ojo” o “yema”, el cual es una protuberancia blanca localizado cerca de la base del tallo, sin embargo no todos los tubérculos la presentan. En el Estado de Ohio se sacan los tubérculos a finales de octubre, el cual coincide con el inicio de las nevadas. Se remueve todo el ramal, quedando al ras del suelo, los tubérculos se dividen y deben tener un tallo por cada tubérculo, lo cual indica que tiene una “yema” u “ojo” (Kerrigan, 1992).

Una vez extraído, se elimina toda la tierra y lava con agua a presión, eliminar todas la raicillas y los tubérculos dañados o enfermos y cubrir las superficies cortados con una solución de azufre. Colocarlos en cajas con una capa de aserrín, vermiculita o "peat moss" en el fondo y parcialmente cubiertos para evitar la desecación, realizar revisiones cíclicas (Kerrigan, 1992). En tanto que Aird (1997) recomendó que se deben de enjuagar en una solución con cloro (200 ml comercial por 3.5 litros de agua), por 15 a 30 minutos luego escurrir y enjuagar, sin embargo tambien recomienda usar combinaciones de fungicidas e insecticidas en lugar de la solución clorada. Y no almacenar por abajo de los 7°C, además no colocar directamente sobre un piso de concreto.

2.4.2. semilla

Normalmente es utilizado por los fitomejoradores para obtención de nuevas variedades. En las camas se debe cuidar de la polinización cruzada que se presenta en esta especie, ya que dicha cruza puede producir un cultivar no puro. En el caso de Estados Unidos se colectan las semillas en septiembre y octubre. Se cortan las cabezuelas de las flores maduras y abiertas, ponerlas en una charola para que se terminen de secar y desprenderse, una vez secas se separan de la paja (Kerrigan, 1992). Se prepara el semillero después que ha pasado el peligro de heladas, sin embargo pueden sembrarse resguardados, la emergencia de plántulas es a los 7 días. En el caso de *D. imperialis*, la germinación en una misma charola varía de 10 a 20 días a 25°C durante el día, a mayores de 30°C durante el día disminuye, todas las semillas emergieron en menos de 8 días. Salmeron (1981) indicó que en dalias cultivadas, la duración máxima para la germinación a 18°C es de 15 días.

2.4.3. Esqueje

Se recomienda colocar los tubérculos a vegetar con una temperatura de 20°C, de aquí se toman los esquejes cuando alcancen una altura de 10 cm, se cortar el brote con o sin el talón, lo que implica cortar todo el brote o por debajo del primer par de hojas.

Cunningham (1998) mencionó que se pueden propagar igual que las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*), plantando secciones de tallo, el cual debe tener dos nudos, se planta a poca profundidad y en una semanas aparecerá los brotes en el nudo superior, no mencionó si estas plantas producen tubérculos. Al igual que Kerrigan (1992) mencionó que los esquejes no se deben cortar por abajo del primer par de hojas, con una longitud de 7,5 a 10.0 cm.

2.5. Plagas y enfermedades

Con la presencia de plagas y enfermedades en cualquier tipo de dalia, no se recomienda, en ningún caso utilizarlos para propagar nuevas plantas (DPPM, 1998) reportaron que La Sociedad Americana de la dalia, reportó como plagas y enfermedades más comunes en cultivares comerciales (*D. variabilis*), las cuales se enlistan a continuación:

Virus del mosaico y jaspeado (Ring MV). Las hojas son verdes claras, con las nervaduras claras y las hojas pueden presentar puntos circulares claros. Las plantas pueden ser enanas y ramificadas. Las medidas de control es la remoción y destrucción de todas las plantas infectadas tan pronto son detectadas. Los tubérculos infectados no deberán ser usados con propósito de propagación. Y se deben de controlar áfidos (*Aphis* spp.), chicharritas (*Empoasca* spp). y trips o piojillo (*thrips* spp.).

Virus del Mosaico de la Dalia (DMV). Las plantas infectadas se atrofian, bandas amarillas y/o verdes pálidas se desarrollan a lo largo de la nervadura de la hoja infectada. Las hojas pueden ser más pequeñas que las normales, rizados y/o puntiagudos.

Virus de jaspeado de la Dalia (DaRingV). en las hojas se forman pequeños círculos amarillos, del tamaño de una moneda pequeña, posteriormente se pueden unir y formar grandes áreas amarillas o verde pálido, centro con tono café. Esta enfermedad puede ser transmitida por tubérculo y esqueje desde plantas enfermas. El mosaico y “ringspot” de la dalia puede ser transmitido por insectos.

Wang *et al.* (1988) indicaron que los virus más importante son el CMV (Virus del Mosaico de las Cucurbitáceas) y/o complejos de DaMV=DMV y CMV, los cuales no pueden ser eliminados con tratamientos químicos. Mori, citado por Wang *et al.* (1988) indicó que el único método práctico para erradicación de virus en plantas con propagación vegetativa, es por medio de cultivo de tejidos, termoterapia y sustancias que inhiben la multiplicación de virus, normalmente se utiliza combinaciones de los dos últimos.

Mildiu polvoriento (*Erysiphe cycloracearum* D.C.). Se caracteriza por un crecimiento blanquecino a grisáceo sobre la superficie de la hoja. Se debe evitar un sombramiento o altas densidades de las plantas.

Pudrición de tubérculos (*Botrytis cinerea*). Como el principal método de propagación es por división de tubérculos, evitar el mal manejo, además es importante la aplicación de un compuesto de azufre en la base del almacenamiento.

Tizón de la flor (*Botrytis* spp.). En épocas húmedas los botones pueden ser atacado por una pudrición blanda y todo el botón puede estar infectado y cubierto con un manto grisáceo o blanquecino.

Además las dalias son susceptibles a marchitamiento por (*Verticillium dahliae* Rke y Berth), marchitez bacteriana (*Erwinia* spp.), pudrición radicales (*Fusarium* spp.), roya sureña (*Uromyces* spp.), carbón negro (*Puccinia* spp.)

2.6. Mejoramiento

Entre las especies silvestres de dalia existen diferencias morfológicas de las plantas, de coloración de la flor y consistencia de las raíces tubérculos, lo cual hace que las respuestas sean muy diferentes bajo las mismas condiciones edáficas. Por otra parte, la altura de la planta y la estructura del tallo, constituyen un factor de interés para aumentar la vida útil de los capítulos; tallos semileñosos como en *Dahlia imperialis* o semisólidos como *Dahlia excelsa* que influyen en la floración (Hammet, 1980).

La forma y posición de los capítulos en el tallo ofrece posibilidades de separar más la inflorescencia del follaje, por ejemplo como *D. scapigera* contra *D. excelsa*. Lo relacionado a frecuencias estomáticas en hojas podrían establecer relaciones interespecíficas de nivel ploidia o inclusive eficiencia en el desarrollo y comportamiento floral (Jorgenson, 1990).

2.7. Reguladores de crecimiento

Fitohormona es un compuesto orgánico que se sintetiza en algún lugar de la planta y que se trasloca a otra parte, en donde a concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, que puede ser promotora o inhibitoria. Existen

evidencias que nos indican que las fitohormonas ayudan a direccionar la traslocación, por ejemplo la removilización de las reservas acumuladas en órganos de almacenamiento como raíces primarias o parénquima del tallo de la caña de azúcar (Salisbury y Ross, 1994). Sin embargo la combinación de reguladores de crecimiento pueden tener efectos aditivos, sinérgicos o inhibitorios (Gifford y Evans, 1981).

Una de las funciones de los reguladores de crecimiento es controlar la actividad genética. Ya que generalmente la actividad de las proteínas receptoras causan un cambio metabólico que conduce a la amplificación de la señal, aunque se dan varios procesos de amplificación en secuencia antes de que finalmente se de la respuesta esperada. Estas sustancias actúan en la membrana plásmica y no en primera instancia en el núcleo, ya que es en las membranas donde existen las proteínas receptoras (Salisbury y Ross, 1994).

2.7.1. Giberelinas

Estas hormonas se descubren en 1926 en Japón a partir de plantas de arroz que alcanzaban grandes alturas, en ese mismo año con extracto de *Giberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) reprodujeron síntomas similares. Para 1990 ya se habían descubierto 84 tipos de giberelinas en varios hongos y plantas, la mayoría en plantas superiores y del hongo *Giberella fujikuroi* (Salisbury y Ross, 1994). Además dicha sustancia puede promover un arreglo más ordenado y transversal de los microtúbulos y microfibrillas, propios de las paredes celulares (Butenko *et al.*, citado por Murashige, 1974). En cultivo *in vitro*, las giberelinas se les asocia con alargamiento de los entrenudos y crecimiento de los meristemas o yemas, además pueden romper el reposo de yemas (Pierik, 1990). Pero inhibe la formación de raíces adventicias (Pierik y

Steegmans, citado por Pierik, 1990), e inhibe la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

En granos, las giberelinas producidas por el embrión estimula las células de la capa de aleuronas para sintetizar y secretar α -amilasa (y otras hidrolasas) las cuales degradan almidón en el endospermo, suministrando azúcares para las plántulas jóvenes (Jacobson y Chandler, 1990).

Este regulador de crecimiento es muy común en semillas, sin embargo se ha logrado su extracción en brotes. Y se le asocia con un alargamiento internodal, sin embargo la mayoría de los diferentes tipos de giberelinas tienen poca o no conocida actividad biológica, algunos son receptores moleculares y unos pocos (AG_1 , AG_3 , AG_4 y AG_7) si cumplen con los requisitos de hormonas primarias (Sponsel, 1990). Salisbury y Ross (1994) mencionaron que estas hormonas están asociados con un alargamiento del tallo y pueden producirse en hojas de plantas jóvenes y en raíces, de hecho gran parte del aporte de giberelinas del sistema aéreo provienen de las raíces vía xilema. Estos mismos autores indicaron que promueve la división y crecimiento celular en el ápice del tallo. Pharis y Ruo, citados por Salisbury y Ross (1994) mencionaron que la mayoría de la dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas responden creciendo más rápido cuando se trata con giberelinas

2.7.2. Auxinas

Se conoce varias formas de síntesis de auxinas, sin embargo el más común es del triptófano, que es un precursor del AIA (el más estudiado entre las auxinas), la presencia de AIA es más concentrado en tejidos jóvenes y partes

en crecimiento, indicando que se sintetizan en meristemos de tallo, hojas y frutos en crecimiento. Además las plantas poseen mecanismos para controlar las cantidades de hormonas tan potentes y la desactivación temporal, con la formación de conjugados auxínicos (Salisbury y Ross, 1994).

El AIA puede traslocarse a través de células parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares, moviéndose a través de tubos cribosos si se aplica a la superficie de una hoja lo bastante madura para exportar azúcares, pero el transporte normal en tallo y peciolo es de las hojas jóvenes hacia abajo; por los haces vasculares (Salisbury y Ross, 1994).

Pierik (1990) señaló que esta hormona generalmente produce alargamiento celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios; frecuentemente embriogénesis en los tejidos en suspensión. El mismo autor indicó que bajas concentraciones de auxinas se forman raíces adventicias y con altas se forman callos. Sin embargo la mayoría de las plantas requieren auxina para conseguir una regeneración radical eficaz, pero en auxinas muy potentes como el 2,4-D y el ANA, generan cantidades excesivas de callo. En tanto que Bonga y Dunstan (1987) mencionaron que en pruebas con tabaco, Solanaceas, *Convolvulus*, *Scurrula* y *Lactuca* formaron brotes con presencia de auxinas. Wang *et al.* (1988) señaló que en dalias, las altas concentraciones de ANA favorecen la formación de callos.

2.7.3. Citocininas.

No existe una definición como tal, sin embargo en 1984 R. Horgan, lo define como sustancia que, en presencia de concentraciones óptimas de auxinas,

inducen citogénesis (división celular), dicha división también se da en tejidos cultivados *in vitro* (Pierik, 1990; Salisbury y Ross, 1994). Sin ser el único lugar de síntesis, en las raíces se sintetizan (en las puntas) y se transporta a las hojas jóvenes, frutos y semillas por el xilema. Se sabe que concentraciones altas de citocininas y sin auxinas (AIA) se producen ramificaciones excesivas en tabaco (Salisbury y Ross, 1994).

El fenómeno de fasciación o “escobas de brujas”, asociado a *Corynebacterium fascians* y donde existe un incremento de los niveles de citocininas. También es común que las citocininas exógenas puedan promover la expansión celular en hojas jóvenes, cotiledones, coleóptilos de trigo e hipocótilo de sandía (Salisbury y Ross, 1994). Las concentraciones elevadas (1 a 10 mg·l⁻¹) pueden promover la formación de vástagos adventicios porque disminuye la dominancia apical, pero se inhibe la formación de raíces (Pierik, 1990).

2.8. Procesos morfogénicos

2.8.1. Totipotencia y clonación

Existen células o tejidos con la potencialidad de formar todo tipo de células y/o regenerar una planta, a lo que se le denomina totipotencia (Pierik, 1990). Una célula no embrionaria tiene el potencial de diferenciarse en células embrionarias y después desarrollarse en una planta nueva completa si el ambiente es favorable. Puede existir totipotencialidad en el desarrollo de tejido calloso cultivado, que producen plantas nuevas o clonación (Salisbury y Ross, 1994).

Un clon consiste de todos los organismos que se han producido asexualmente a partir de un organismo individual antecesor. El hecho de que algunas células son totipotentes no demuestra que todas las células son totipotentes; en cualquier tejido tisular hay muchas células que no llegan a ser embriones (Pierik, 1990; Salisbury y Ross, 1994).

2.8.2. Organogénesis

La organogénesis es la formación de un sistema aéreo o raíces adventicias (o ambos) a partir del callo (Pierik 1990). Según Thomas y Davey, citados por Pierik (1990) indicaron que los callos son más capaces de regenerar raíces, que los vástagos adventicios. Las raíces y los vástagos se forman por lo general de forma completamente independiente unos con respecto a los otros, es decir, no existe conexión entre ellos, aunque se originen de un mismo callo y al mismo tiempo (Pierik 1990).

2.8.3. Embriogénesis somática

La embriogénesis es la formación de un embrión que se transforma en órganos aéreos y radicales, se le conoce como embriogénesis somática, en la cual las células somáticas (no reproductoras) haploides o diploides se transforman en plantas diferenciadas a través de etapas embriológicas características y depende del estado de desarrollo de la célula o tejido. Se realiza más fácilmente en los tejidos que morfológicamente son más embrionarios (juveniles). Sin embargo pueden existir grandes diferencias, en la capacidad de división celular y regeneración en plantas de una misma especie (Pierik, 1990).

Cuando el embrión o fases juveniles madura, solo un grupo de células epidérmicas pueden formar un embrión o de células epidérmicas individuales

pueden formar embriogénesis. Y cuando un tejido es completamente maduro, la embriogénesis solo es posible después de que se ha inducido un callo, con mayor probabilidad, si el callo proviene de tejido reproductivo incluyendo yemas florales, óvulos, tejido somático de anteras, embriones maduros o inmaduros o cotiledones y menos probable de tallos, yemas de callo, primordios florales y radicales (Salisbury y Ross, 1994).

2.9. Cultivo *in vitro*

Para el cultivo comercial y el mejoramiento genético se explotan las ventajas que ofrece los sistemas de regeneración *in vitro* como son: cultivo de embriones, producción de plantas libres de enfermedades, micropropagación de muchas especies, variación somaclonal, fertilización *in vitro*, inducción de haploides, manipulación genética, transformación e inducción de mutaciones, aislamiento de mutaciones y duplicación de cromosomas (Pierik, 1994). De hecho el único método práctico para erradicación de virus es por cultivo de meristemo y para incrementar material vegetal libre de virus (Mori, citado por Wang *et al.*, 1988). Se puede utilizar cualquier órgano o tejido como explante, sin embargo, se deben considerar que el tejido sirva como tal, la edad fisiológica del órgano, época de obtención, tamaño del explante y condiciones de obtención (Murashige, 1974; Pierik, 1990). Para multiplicar plantas *in vitro* por formación de órganos o embriones adventicios, es necesario que sean capaces de regenerarse y esta capacidad esta determinada por el genotipo, condiciones ambientales (nutrimentos, reguladores de crecimiento y condiciones físicas) y el estado de desarrollo de la planta (Pierik, 1990).

2.9.1. Etapas de cultivo *in vitro*

La sistematización en la propagación por cultivo de tejidos, presenta un esquema general, que consiste en etapas, generalmente tres, y cada una puede

presentar características específicas. En cada etapa se presentan diferentes objetivos y posiblemente diferentes requerimientos. Es común que sean las mismas condiciones, tanto el medio de cultivo como las condiciones ambientales en dos etapas, normalmente la etapa uno y dos, con la misma composición y forma del medio, además las mismas condiciones de luz y temperatura, normalmente las condiciones de la etapa 3 es diferente, dado que los objetivos son diferentes (Murashige, 1974). En los apartados siguientes se explican.

2.9.1.1. Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico

El objetivo principal es obtener cultivo en condiciones asépticas de la planta en cuestión. Este cultivo puede proceder de cualquier parte de la planta, como ápices vegetativos, radicales, callos, etc. La proporción de sobreviviente en esta etapa debe ser lo mas alto posible y que garanticen un rápido crecimiento poblacional (Murashige, 1974).

2.9.1.1.1 oxidación

La oxidación es un fenómeno asociado a cambios en la permeabilidad de la pared celular o cambios en las estructuras internas de los organelos, en donde están involucradas enzimas oxidativas, normalmente peroxidasas, catalasas y fenoloxidasas (Fric, 1981). Cuando las reacciones son incontrolables, surge el fenómeno de desnaturalización de las proteínas, por la ruptura de los enlaces de hidrógeno y el resultado es una precipitación en forma de color oscuro (Fessenden y Fessenden, 1985; Pierik, 1994). Sin embargo el resultado de esta precipitación son dos fenómenos denominados oxido-reducción y en donde se involucran directamente los fenoles, los cuales son compuestos aromáticos, al que se unen diversos grupos sustituyentes como hidroxilo, carboxilo y metoxilo ($-O-CH_3$), como son triptófano, tirosina, fenilalanina, ác. cinámico, etc., por

ejemplo, el ácido clorogénico; en tejido de papa se forma en cantidades altas y su oxidación seguida de una polimerización por radicales libres causa la formación de quinonas, responsables del oscurecimiento que se aprecia en los cortes de los tubérculos frescos (Salisbury y Ross, 1994).

Existen algunas sustancias que atenúan la presencia de oxidaciones en los tejidos, como los antioxidantes, los más comunes son: el ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cisteína, los cuales impiden la oxidación de los fenoles (Pierik, 1994). El ácido cítrico es importante porque actúa como un inhibidor de la oxidación y pérdida de CO₂ del piruvato (Salisbury y Ross, 1994). Sin embargo el carbón activado puede actuar como agente antioxidativo en concentraciones de 0.2 a 3.0 % p/v, puede absorber sustancias sólidas y líquidas asociadas con la oxidación (Pierik, 1994).

En el procedimientos para detectar virus, en pelargonium, orquideas y dahlias, únicamente en la última especie fue necesario la adición de antioxidante o mercaptoetanol para evitar que el extracto se oxidara (Albouy *et al.*, 1994).

2.9.1.2. Fase II: Multiplicación del propágulo

El propósito es un incremento del número de órganos o tamaño de la estructura, de donde se tomará para formar una planta, ya sea por la formación o desarrollo de un embrión u órgano. En muchas especies tienen una multiplicación de órganos, en las cuales se reduce el coeficiente de propagación (Murashige, 1974). Torres (1989) indica que el método de multiplicación por yemas axilares, es el más usado en términos de número de géneros que puede ser propagado.

En esta etapa se considera el método por el cual se llevará a cabo la multiplicación, por ejemplo brotes adventicios, embriones asexuales, brotes axilares. En especies como *Nicotiana glauca*, en donde las secciones de tallo o callos no existe inducción de raíces adventicias o brotes en respuesta a la aplicación de auxinas o citocininas (Murashige, 1974).

2.9.1.3. Fase III: Preparación para restablecimiento de la planta a suelo

El éxito de un método de cultivo de tejido, es la alta frecuencia del establecimiento de plantas en suelo derivadas de este cultivo. Esta etapa es entendida como preparar al propágulo para la transferencia a suelo. Esta etapa incluye el proceso de enraizamiento, preparación para tolerar un cierto grado de estrés, resistencia a patógenos y conversión de plantas heterotróficas a autotróficas (Murashige, 1974). Sin embargo el enraizamiento puede ser tanto *in vitro* como *ex vitro* o fuera del frasco (Torres, 1988).

2.9.2. Medio de cultivo

Los requerimientos necesarios para un medio nutritivo se pueden clasificar en tres categorías: mezcla de sales inorgánicas, sustancias orgánicas y complejos naturales, además del agar y agua. Las sales inorgánicas son tanto de macroelementos como microelementos, las sustancias orgánicas son las vitaminas, carbohidratos, antioxidantes y los complejos naturales incluyen a todas las hormonas y reguladores de crecimiento. Las combinaciones de sales deben de cubrir los requerimientos, el más común y que ha demostrado ser adecuado tanto en plantas y órganos es la fórmula de sales MS (Murashige, 1974; Pierik, 1990).

El contenido de carbohidrato se satisface fácilmente, con la incorporación de 2 a 3% de sacarosa. Se incluyen vitaminas como tiamina, inositol, ácido nicotínico, el único imprescindible es tiamina en un intervalo de 0.1 a 0.4 mg.l⁻¹. El ácido ascórbico ha sido usado particularmente en combinaciones con ácido cítrico para retardar el oscurecimiento del tejido incubado en combinaciones variables. En la etapa dos es común la utilización de purinas y adeninas, aunque también se utiliza otras base nitrogenadas (Murashige, 1974).

Sin embargo los componentes orgánicos más críticos en un medio son las auxinas y citocininas, el AIA es una auxina débil, en cambio el AIB, ANA y 2,4-D son más activas (Pierik, 1994; Torre, 1989), en particular el 2,4-D puede ocasionar un crecimiento desorganizado y mutaciones (Torres, 1989). En citocininas el 2-ip es el más efectivo sin embargo BA y kinetina se obtienen buenos resultados, los requerimientos de citocininas en algunas especies pueden ser de hasta 30 mg.l⁻¹ (Skoog y Miller, 1967).

El efecto promotivo de adenina sobre iniciación de brotes (Murashige, 1974). Miller y skoog, citados por Murashige (1974) mostraron que el sulfato de adenina tiene un efecto de revertimiento del efecto anticaulogénico de auxinas, demostrando una competencia entre sulfato de adenina y AIA en la formación de brotes en secciones de tallo de tabaco. Nitsch *et al.*, citados por Murashige, 1974) sugieron que la adenina favorece la multiplicación de células diploides sobre células endopoliploides, lo cual incrementó la iniciación de órganos Salisbury y Ross (1994) mencionaron que el sulfato de adenina promueve la división celular, por ser un constituyente del ADN.

Gautheret, citado por Murashige, (1974) mencionó que en *Helianthus tuberosum* la presencia de luz puede sustituir las necesidades de giberelinas. Pero es conocido que con luz las giberelinas pueden inhibir la formación de raíces, sin embargo en oscuridad y con auxinas puede estimular enraizamiento.

2.9.3. Luz

La iluminación esta considerada en términos de intensidad, longitud del día y calidad, aunque en cultivo de tejido la fotosíntesis no es absolutamente necesario, al menos en etapa 1 y 2. La luz es necesario para regular ciertos procesos morfogénéticos como la formación de brotes, inducción de raíces y embriogénesis asexual (Ueda y Torikata 1972). Torres (1989) indicó que en ciertas especies es necesario la presencia de luz para iniciar el proceso de enraizamiento en ciertas especies.

2.9.3.1. Intensidad de luz

La gran variabilidad de las respuestas a la intensidad varía conforme a las especies y a las etapas del proceso de producción *in vitro*, en el caso de *Asparagus*, *Gerbera*, *Saxifraga* y bromelias se ha descubierto una intensidad óptima de 1000 lux para la etapa 1 y 2, en tanto que para la etapa 3 es de 3000-10,000 lux, las altas intensidades de luz en la etapa 3 es principalmente para incrementar el porcentaje de sobrevivencia en suelo (Murashige, 1974). En tanto que Vasil y Thorpe (1991) indicaron que generalmente las intensidades de luz, pueden incrementar la embriogénesis y organogénesis, sin embargo Webb (1994) indicó que todas las longitudes de onda fomentan o activan la oxidación de fenoles.

2.9.3.2. Periodo de luz

Las respuesta a las variaciones en la duración de luz en una especie no es muy contrastante como el caso de la intensidad. Gautheret, citado por

Murashige (1974) describe como 12 h ideal para iniciar enraizamiento en secciones de tubérculos de *Helianthus*. En cambio para diferenciación de raíces y brotes de callos en *Nicotiana*, el periodo del luz óptimo es de 16 horas usando una intensidad de luz de 1000 lux. Webb (1994) mencionó que en cultivo de protoplasto de lechugas se requiere una incubación de 11 horas de luz para disminuir los efectos de oxidación.

2.9.3.3. Calidad de la luz

Weis y Jafre, citados por Murashige (1974) determinaron que la porción crítica del espectro de la luz para la inducción de brotes fue la región azul, en cambio la luz roja (660 nm) no se observó ningún efecto. En contraste la luz roja favorece la inducción de raíz pero no el azul. Sin embargo el azul descompone el AIA, pero no el ANA (Pierik, 1990). Estas y otras observaciones realizadas indican que los procesos organogénéticos *in vitro* son fenómenos fotomorfogénéticos, más probablemente regulado por fitocromos (Murashige, 1974).

Las lamparas de luz fluorescentes que normalmente son utilizadas para las cámaras de incubación, emiten luz ultravioleta (2.15%), dicha emisión puede ser nociva para las peroxidasas, rifoflavina, triptofano y tirosina. Además esta longitud de onda es absorbida por flavonoides y quinonas en la cadena respiratoria y la energía es transferida al ADN, pudiendo causar daños mutagénicos o alteraciones enzimáticas (Bonga y Durzan, 1985).

2.9.4. Temperatura

Es importante reconocer los requerimientos de fluctuaciones mínimas y máximas diurnas y las variaciones estacionales, este último es importante para especies que presentan dormancia. En estudios con *Chondrilla juncea* hechas por Kefford & Caso, citados por Murashige (1974) muestran que el régimen óptimo en la cual se obtuvo el mayor grado de brotes adventicios fue de 21 a 27°C durante el día y 16 a 22 durante la noche. Sin embargo para la producción de brotes en callos de tabaco el más alto fue a temperatura de 18°C en cambio a 33 y 12°C disminuyen drásticamente (Skoog y Miller, 1967). Normalmente en bulbosas es a 18 °C, o una temperatura altas para especies tropicales de 28-29°C, Pero generalmente la temperatura ideal para crecimiento *in vitro* es de 3-4 °C más alta que para crecimiento *in vivo* (Pierik, 1990).

2.10. Cultivo *in vitro* de dalias

Aunque se da por hecho la micropropagación de dalia, es evidente que no se cuenta con un sistema de regeneración *in vitro* que garantice una respuesta uniforme y favorable para la obtención de un mismo genotipo (Hernández y Mejía, 1994). Ya que no se ha reportado una organogénesis como consecuencias del efecto de algún tratamiento, en trabajos realizados por Read y Gavilertuatana, citados por Hernández y Mejía (1994) mencionaron que se logró únicamente callo a partir de segmentos de hoja o de flores liguladas en un medio MS, adicionando BAP y ANA; en cualquier caso se regeneraron únicamente callo. Sin embargo Hernández y Mejía (1994) reportaron que lograron una desdiferenciación de botones en *D. pinnata*, asociándolo con la aplicación de AIA y BAP, además lo asociaron con la presencia de citocininas internas.

Actualmente la micropropagación y multiplicación *in vitro* de dalias comerciales es para control sanitario, principalmente de virus (Albouy *et al.*, 1994); indicando que en Francia el uso de la micropropagación *in vitro* ha logrado una mayor calidad en la sanidad de las plantas. Wang *et al.* (1988) mencionaron que el procedimiento de propagación por medio de meristemos, podemos obtener dalias sanas desde planta que es conocido que esta infectada por DaMV o del complejo DaMV y CMV, lográndose en seis meses (subcultivando), una eficiencia de 81.2 hasta 100%, dependiendo de los cultivares. El cultivo *in vitro*, además de ser potencial para erradicación de virus, también incrementa rápidamente las plantas libres de virus.

2.10.1. Metodologías

En los trabajos donde se han obtenidos buenos resultados en *D. pinnata*, se han utilizado meristemos apicales y axilares con un tamaño de 0.2 a 0.8 mm (Wang *et al.*, 1988; Shatilo *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991 y Hernández y Mejía, 1994). Aunque Hernández y Mejía (1994) reportaron un 25% de los explante, la obtención de organogénesis partiendo de botones florales de *D. pinnata*.

Para la desinfección del material, primero se enjuagó en agua corriente, después se sumergió en alcohol por un minuto (Wang *et al.*, 1988; Hernández y Mejía, 1994); posteriormente se paso al hipoclorito de sodio al 1.8 % y Tween 20, por 25 minutos (Hernández y Mejía, 1994), Wang *et al.* (1988) mencionaron que esterilizó utilizando hipoclorito de calcio al 5% durante 15 minuto. En ambos casos se realizó tres enjuagues con agua esterilizada y en condiciones de asepsia; el medio utilizado fue MS con un pH desde 5.5 a 5.7, 8 g·l⁻¹ de agar en caso de solidificación y de 20-30 g·l⁻¹ de sacarosa (Wang *et al.*, 1988; Hernández y Mejía, 1994).

En ensayos hechos por Wei *et al.* (1990), obtuvieron los mejores resultados para la proliferación de brotes en *D. pinnata* (Cav) en un medio MS suplementado con 3 mg·l⁻¹ de BA + 0.2 mg·l⁻¹ de ANA + 10 mg·l⁻¹ de AG₃ + 50 mg·l⁻¹ de sulfato de adenina, aunque la respuesta entre las cinco variedades probadas varía demasiado.

El cultivar Fatima tiene una sobrevivencia en 15 días del 65.6 % en medio líquido y 44.4 % en medio sólido. En el medio se le adicionó 0.5 mg·l⁻¹ isopenteniladenina (IPA) + 0.5 mg·l⁻¹ de kinetina + 0.5 mg·l⁻¹ de ANA + 1.0 mg·l⁻¹ de AG₃ (Wang *et al.*, 1988), el tratamiento donde obtuvieron un mayor crecimiento de ápices fue 0.1 mg·l⁻¹ de AIA y sin BAP y este mismo tratamiento fue el mejor para enraizamiento.

Shatilo *et al.* (1991) indicaron que el ácido giberelico (AG₃) a una concentración de 4 mg·l⁻¹ es necesario para el desarrollo de los meristemas, dichos explantes se obtuvieron a mediados de junio, en un medio sólido.

A las tres semanas de iniciado la brotación de los meristemas se traspasa a un medio para enraizamiento, en este caso fue solidificado con Difco Bacto agar 8 g·l⁻¹ y suplementado con 2 g·l⁻¹ de carbón activado o 1 mg·l⁻¹ de AIB + 0.5 mg·l⁻¹ de ANA + 0.2 mg·l⁻¹ de IPA, en ambos casos se obtuvieron niveles de enraizamiento dependiendo de los cultivares probados desde 40 hasta 92 % (Wang *et al.*, 1988). Shatilo (1991) reportó los cultivares Triomphe de Paris y Golden Heart con gran capacidad para enraizar con la adición de AIA y su contraparte sintética AIB en concentraciones de 0.03 y 0.1 mg·l⁻¹. Para Wei *et al.* (1990) los mejores resultados para enraizamiento fueron en un medio MS al 50% suplementado con 0.2 mg·l⁻¹ de ANA + 20 g·l⁻¹ de sacarosa. Y en tres semanas todas los brotes formaron callos.

En algunos cultivares de dalias los meristemas cortados de brotes jóvenes desarrollan más rápido que los brotes viejos, sin embargo no influye si los meristemas provienen de la parte apical o basal, tampoco la época de corte. El efecto de la intensidad de luz es también involucrado en el desarrollo de meristemas, ya que con intensidades bajas no se tiene alargamiento (Wang *et al.*, 1988). En los ápices probados por Hernández y Mejía (1994) mencionaron que los ápices tienen una fuerte dominancia, por lo que se obtiene un solo tallo.

2.11. Transformación genética

Teóricamente con esta técnica se puede introducir uno o más genes dentro de las células de una planta. Existen muchas especies en donde la transformación resulta exitoso, sin embargo una especie puede requerir de una metodología propia. Podemos mencionar dos formas de obtener plantas transgénicas, la mediación de *Agrobacterium tumefaciens* y la introducción mecánica de partículas del ADN. Sin embargo la mayoría de las plantas transgénicas se han obtenido usando de *A. tumefaciens* (Fisk y Dandekar, 1993).

La producción de plantas transgénicas involucra dos distintos procesos. a) la transferencia del gen dentro de la célula y b) el desarrollo de una planta completa y su progenie a partir de esta célula. Este último proceso involucra un proceso selectivo de las células de interés, denominado selección positiva, en donde bajo estas condiciones únicamente se desarrollarse aquellas que tengan el gen foráneo. En el proceso selectivo último, involucra la incorporación de marcadores genéticos, como el gen *nptII* que codifica para la enzima, neomicina fosfotransferasa II, el cual inactiva por fosforilación a antibióticos aminoglicósidos, como kanamicina, paromocina, gentamicina, etc. Sin embargo, el más usado es la kanamicina, aunque puede disminuir la capacidad regenerativa de los callos (Wang *et al.*, 1995). Otro marcador es la selección de células transformadas con β -glucuronidasa (GUS), en donde una citocinina

conjugada con un glucurónico, las células transformadas son las únicas con la capacidad de hidrolizar este conjugado y por lo tanto de liberar la citocinina que les permita desarrollarse *in vitro* (Martín, 1997).

Por lo que respecta a los sistemas de transformación genética, hasta el momento se han desarrollado varios, con diferentes grado de eficiencia, aquellos que se valen de procesos biológicos para la introducción del ADN y aquellos que lo hacen por medios físicos. Para el primer caso los vehículos más utilizados son: *A. tumefaciens* y *A. rizogenes* (Salisbury y Ross, 1994). El efecto en petunia por la introducción de genes de la chalcona sintetasa (CHS), en diversas posiciones del genoma, produjo una gama de colores en las flores (Robinson y Firoozabady, 1993; Verma, 1993; Elomaa y Holton, 1994). Se reconoce que los flavonoides producidos a partir de la reacción de la CHS, le sirven a la planta para varias funciones como la producción de color por las antocianinas o bien para la protección contra la luz ultravioleta generada por la luz solar. Se sabe que otros flavonoides diferentes de las antocianinas absorben la luz ultravioleta (Verma, 1993).

2.11.1. *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens es una bacteria fitopatógena aerobia Gram negativa que causa el trastorno conocido como “agalla de la corona”, caracterizada por la producción de tumores en el tejido. El mecanismo patogénico se basa en la transferencia de información genética al genoma de la planta infectada. Esta información se localiza en un megaplásmido (± 200 Kb) llamado plásmido Ti (inductor de tumores), dentro del cual se encuentra una región denominada ADN-T (ADN transferible) que es el que se inserta y expresa en la planta. El resultado de esta introducción se manifiesta en la producción de enzimas involucradas en la biosíntesis de auxinas, citocininas y opinas. Dentro de las funciones de las enzimas involucradas en estos procesos se encuentran la

conversión del triptofano a ácido indolacético y síntesis de citocininas. Al tener una sobreproducción de auxinas y citocininas se forma un crecimiento desordenado, dando origen a los tumores (Martín, 1997).

La habilidad de la cepa bacteriana para transformar una células vegetal puesta en cocultivo, esta basado en la eficiencia del sistema de selección para las células transformadas, eficiencia del sistema de cocultivo *in vitro* y la estabilidad del nuevo ADN incorporado al genoma vegetal (Dandekar, 1992). Braun, citado por Herrera-Estrella (1984) mencionó que una vez inducido el tumor, no requiere de la presencia de la bacteria para continuar desarrollándose y puede ser cultivado *in vitro*, el cual genera sus propias hormonas y el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. Herrera-Estrella (1984) mencionó que este tumor tiene dos propiedades: la capacidad para crecer *in vitro* sin el suplemento de reguladores de crecimiento que normalmente se requieren y la capacidad para sintetizar un conjunto de nuevos metabolitos conocidos como opinas, los cuales no están presentes en las células normales, las opinas son aminoácidos o derivados de azúcares que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno por la bacteria responsable de incitar el tumor. La producción de plantas morfológicamente normales que contengan y expresen los genes introducidos ha sido posible por el uso de un vehículo natural que transfiere los genes como *Agrobacterium* spp. Dentro de la cadena de ADN de esta bacteria, en la zona Ti ha sido removido y reemplazado con genes quiméricos para inducir resistencia a los antibióticos, lo que permite lograr una expresión de los genes modificados (Horsch *et al.*, 1985).

2.11.2. Método de Horsch *et al.*

Inicialmente la transformación era la derivación de planta a partir de cultivo de protoplastos, que se sembraban conjuntamente con células de *A. tumefaciens*, sin embargo muchas plantas presentan muchas dificultades para la

viabilidad, en algunos caso para lograr una regeneración en algunas especies es de hasta 6 meses y las plantas pueden ser más susceptibles a mutaciones. Por lo anterior se ha buscado introducir los genes directamente a las células, particularmente en los tejidos de hojas, además las cepas específicas han sido modificadas en sus estructuras de la cadena genética, con genes quiméricos para la resistencia a la kanamicina y donde el vector (en este caso *A. tumefaciens*) contiene el gen de importancia para que se exprese alguna característica en la planta (Horsch *et al.*, 1985). El gen utilizado *nptII* codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II) es la modificación genética más universalmente utilizada, esta enzima inactiva por fosforilación un número de compuestos de antibióticos tipo aminoglucosidos, incluyendo kanamicina, paromomicina, gentamicina, etc. (Wang *et al.*, 1995)

Se han hecho las pruebas con cortes de hojas en forma de discos, colocándolos sobre un pedazo de papel (6 mm de diámetro) y sumergido en un medio que previamente se le ha inoculado con la bacteria por una noche, sin luz e incubado a 28°C, este medio no debe ser completamente sólido. Se agita las hojas para asegurar la infección en todos los bordes, posteriormente son sacados y secados con papel. Se incuban en un medio para inducir brotación. La edad y dosificación de la bacteria tiene poco efecto sobre la transformación; sin embargo se debe evitar remojar en el medio con la bacteria por mucho tiempo. Pasados 1 a 3 días, los discos son transferidos a cajas de petri, con algún tipo de medio con reguladores de crecimiento y conteniendo carbenicilina (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) o kanamicina (300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), que son antibióticos que permite el desarrollo de las células que han recibido el gen foráneo que previamente se ha modificado. Después de 2 a 4 semanas, los brotes desarrollados de los callos se transfieren a un medio adecuado para enraizar, este medio debe contener carbenicilina (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) o kanamicina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Horsch *et al.*, 1985).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar donde se realizó la investigación

El establecimiento del sistema de regeneración se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia, U.A.Ch. y la inoculación con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fue en el CINVESTAV-Irapuato.

3.2. Material vegetal

Debido a la diferencia entre las dos especies, se menciona el procedimiento para la obtención del material vegetal de cada una.

Dahlia imperialis, que se caracteriza por no formar tubérculos, simplemente un engrosamiento del cuello de la raíz, estructura que es suficiente para que se tenga brotación cuando las condiciones de humedad y temperaturas sean adecuadas. Sin embargo, esta especie produce semillas, se colocaron las semillas en charolas de unicel, en un sustrato de tierra con "pitmoss". bajo condiciones de invernaderos, en el área de Fisiología del Departamento de Fitotecnia, a inicio de febrero de 1997. A los dos meses se transplantaron a un lote del Campo Experimental.

En las evaluaciones del grado de desarrollo, el cual comprende plantas jóvenes y maduras, para el primer caso se estableció los semilleros dos meses antes de establecer el ensayo, para tener las plántulas de un tamaño de 20 cm.

Para *Dahlia. excelsa*, se utilizaron tubérculos, ya que esta especie si las produce contrario a la especie anterior y son de gran tamaño. Puede presentar tres formas de flores en la misma planta, pero no produce semillas en ninguna de estas formas. Dado el fenómeno anterior los tubérculos se plantaron a finales de febrero de 1997, mes en la que inician su brotación. Se ubicaron en un lote anexo a la especie anterior.

En esta especie también se evaluó el grado de desarrollo, los caules fueron plantas jóvenes y maduras. Como se mencionó anteriormente no produce semilla, únicamente se realizó una poda severa a las plantas para tener una brotación, para evaluar brotes jóvenes, actividad que se realizó 4 semanas antes de su utilización.

Para evitar el periodo de heladas invernales 1997-1998, y por la susceptibilidad de estos materiales, se podaron 10 ejemplares de las dos especie y se trasladaron en el mes de noviembre a invernaderos de cristal para evitar daños por los cambios bruscos de temperatura. En ambas especies se presentó la brotación de yemas basales sin diferenciación a floración, aún cuando en ambas especies estaban en plena floración, por los fotoperiodos cortos propios de esta temporada. La inducción de las yemas fue notoria a las 4 semanas de la poda y principalmente del cuello y en el punto de corte o poda del tallo.

3.3. Establecimiento del sistema de regeneración

Para establecer el sistema de regeneración *in vitro* de estas dalias, se inició probando en medio MS (Murashige y Skoog), el cual se ha notado efectividad para la regeneración de dalias comerciales (*D. variabilis* Cav) (Hernández y Mejía, 1994). A este medio se le adicionó 100 mg·l⁻¹ de inositol, 1 mg·l⁻¹ de tiamina, 30 g·l⁻¹ de sacarosa, ajustando el pH a 5.6±0.1, y las pruebas

con medio líquido se utilizó puente de papel. La solidificación con agar $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y la esterilización fue en autoclave a una libra de presión a 120°C por 15 minutos, cuando se requirió de la utilización de antibióticos y AG₃ se esterilizó con membrana millipore de $0.2 \mu\text{m}$, el cual posteriormente se explicará. Las condiciones de incubación fueron de un fotoperiodo de 16 h luz, a $27\pm 2^\circ\text{C}$ y una intensidad de 1200 lux. Se efectuaron diferentes modificaciones en los componentes del medio de cultivo, tanto en sales inorgánicas, sustancias orgánicas y complejos naturales, las cuales se indican en los apartados correspondientes.

Se iniciaron los primeros ensayos en el mes de agosto de 1997, con la utilización de explantes como tallo, peciolo, hoja, yemas laterales y ápices. Para octubre, mes en el cual presentan los botones florales, se evaluaron dichas estructuras en ambas especies. Las actividades realizadas se representan en la Figura 1.

3.3.1. Manejo del material

Se aplicaron en ambas especies, en campo, en el mes de junio y julio, Cuprimicin 500 a $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, Benlate $1.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y Tamaron $0.5 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ para reducir los problemas de plagas y enfermedades. Además se fertilizó con Triple 17, cada 2 meses. La obtención del material para explantes fue de las zonas apicales.

3.3.2. Desinfección del material

Todo el material a utilizar, se desinfectó de la siguiente manera, un enjuague en agua corriente con jabón por 5 minutos para la eliminación del polvo y/o insectos o ácaros. Posteriormente se sumergió en alcohol al 70% por menos de un minuto, inmediatamente se pasó el material a una solución de

hipoclorito de sodio comercial equivalente al 1.5% de ingrediente activo, se colocó en la cámara de flujo laminar por 20 minutos, posteriormente tres enjuagues con agua deionizada y esterilizada en condiciones asépticas.

En evaluaciones posteriores se probó el efecto de la disminución tanto el tiempo de enjuague con agua y jabón, como a la exposición en la solución con cloro, con la finalidad de reducir los daños por hiperhidratación de los tejidos, en este caso se tomó el material en condiciones de invernadero.

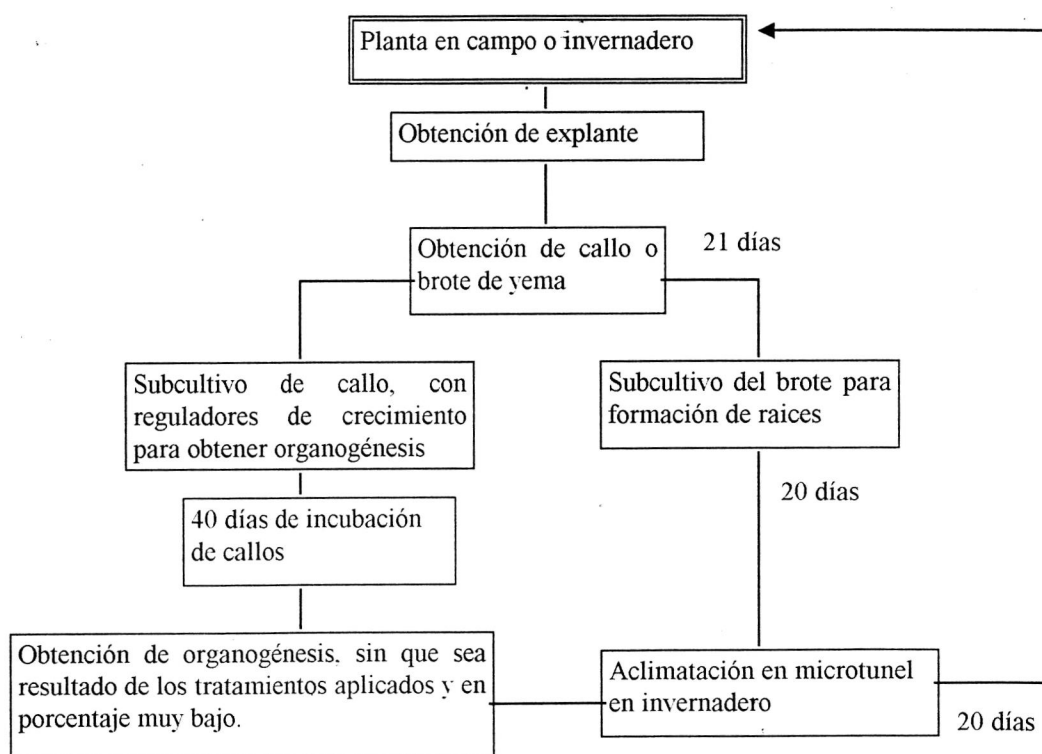


Figura 1. Actividades realizadas para establecer el sistema de regeneración en *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997-98.

3.3.3. Evaluaciones

Todas las evaluaciones estaban relacionadas con la búsqueda de una metodología para la propagación eficiente de estas especies y en donde cada evaluación corresponde a un requerimiento o búsqueda de una mejor respuesta que nos condujera a cumplir los objetivos de la regeneración. Los resultados obtenidos de un ensayo eran retomadas para plantear un posterior y buscando mejorar el sistema de propagación. También se determinó los explantes más adecuados y descartando otros por su respuesta viabilidad y respuestas.

Los primeros ensayos se realizaron en el mes de agosto de 1997, sin embargo continuaron por todo el periodo invernal, dado que se obtuvo el material vegetal bajo condiciones de invernadero.

3.3.3.1. Prueba de explantes

Se sembró en un medio MS básico para determinar el comportamiento de los diferentes explantes, el grado de oxidación y como afecta el tamaño de un explantes. Se sometió a evaluación los explantes presentes, tallo, hoja, yemas laterales, yemas apicales y peciolo de las dos especies.

D. excelsa

T1: tallo (tamaño fue de 0.5 a 0.8 cm² y cortados a la mitad).

T2: hojas (tamaño desde 0.5 a 1.0 cm²).

T3: yemas laterales.

T4: ápices (de menos de 1.0 cm).

T5: peciolos (de 1.0 a 1.5 cm de longitud).

D. imperialis

T1: tallo (tamaño fue de 0.5 a 0.8 cm² y cortados a la mitad).

T2: hojas (tamaño desde 0.5 a 1.0 cm²).

T3: yemas laterales.

T4: ápices (de menos de 1.0 cm).

T5: peciolo (de 1 a 1.5 cm de longitud).

Para evaluar, se denominó como unidad experimental a un tubo de ensaye con un explante y cada tipo de explante se consideró un tratamiento, se evaluaron 10 repeticiones en cada tratamiento. El parámetro de medición establecido, fue que un tejido se consideró oxidado cuando presentó más del 50% del total oxidado.

3.3.3.2. Prueba de antioxidantes

Debido al nivel de oxidación presentada en los tejidos, probados en el ensayo anterior fue necesario probar algunos tratamientos para reducir su presencia. Se utilizaron antioxidantes, las cuales fueron una combinación de 75 mg·l⁻¹ de ácido cítrico, 50 mg·l⁻¹ de ácido ascórbico y 25 mg·l⁻¹ de L-cisteína, además de los enjuague empleado, con el objetivo de remover fenoles y taninos que causan el oscurecimiento de los tejidos u oxidación.

Tanto para *D. excelsa*, como *D. imperialis* se evaluaron los diferentes tipos de explantes (factor A), tallo, hoja, yemas laterales, yemas apicales y peciolo. Y las técnicas para reducir la oxidación (factor B). La combinación del factor A y B, da un total de 20 combinaciones o tratamiento y en cada tratamiento con 10 repeticiones, que a continuación se representan en el cuadro 1.

Factor (A)

T1: Remojar en agua corriente por 12 horas y con antioxidantes en el medio.

T2: Remojar en agua con antioxidante por 6 horas.

T3: medio con carbón activado 10 g·l⁻¹.

T4: Medio líquido.

Factor (B): Tallo, ápice, yemas laterales, peciolo y hoja.

Cuadro 1. Combinaciones del factor A y B, para determinar el efecto de los métodos y los tipos de explantes sobre la oxidación, en *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1997.

T1 + tallo	T1 + ápices	T1 + yemas laterales	T1 + peciolo	T1 + hoja
T2 + tallo	T2 + ápices	T2 + yemas laterales	T2 + peciolo	T2 + hoja
T3 + tallo	T3 + ápices	T3 + yemas laterales	T3 + peciolo	T3 + hoja
T4 + tallo	T4 + ápices	T4 + yemas laterales	T4 + peciolo	T4 + hoja

Del ensayo anterior, fue necesario probar algunas variantes de los tratamientos, debido a los resultados obtenidos. Se evaluaron los mismos explantes, con combinaciones de sales y carbón activado.

T1: sales al 100%

T2: sales al 50%

T3: sales al 100% + carbón activado 10 g·l⁻¹.

T4: sales al 50% + carbón activado 10 g·l⁻¹.

Similar para el caso anterior, se hace una combinación entre las variantes para el control de oxidación y el tipo de explante, resultando 20 combinaciones (cuadro 2) y cada combinación con 10 repeticiones.

Cuadro 2. Combinaciones de las técnicas para reducir la presencia de oxidación y los tipos de tejidos de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1997.

T1 tallo	T1 ápices	T1 yemas laterales	T1 peciolo	T1 hoja
T2 tallo	T2 ápices	T2 yemas laterales	T2 peciolo	T2 hoja
T3 tallo	T3 ápices	T3 yemas laterales	T3 peciolo	T3 hoja
T4 tallo	T4 ápices	T4 yemas laterales	T4 peciolo	T4 hoja

En cada tipo de explante, se evaluaron el nivel de oxidación y el tiempo en presentarse. También se observó la presencia de callo en hoja, tallo y peciolo. En yemas se evaluó si presentó crecimiento. En el caso del nivel de oxidación se utilizaron los siguientes niveles para determinar la severidad y fueron los siguientes: 0= < 10%, 1= $\geq 10 < 30\%$, 2= $\geq 30 < 60\%$, 3= $\geq 60 < 90\%$ y 4= $\geq 90\%$, la última escala se consideró un tejido con 90% de oxidación, como tejido muerto.

El diseño experimental para este ensayo fue completamente al azar con dos factores, para hacer comparaciones y determinar el tipo de explante que presenta los niveles mas altos y e que tratamientos disminuyen. Los datos de oxidación se analizaron con el método no paramétrico de kruskal-Wallis, dicho análisis de varianzas fue sobre la escala arbitraria.

3.3.3.3. Prueba de citocininas

En este caso se sometió a evaluación tallos y hoja, el objetivo de este ensayo fue buscar la formación de callos compactos y luego la morfogénesis. Se utilizó un medio MS, con la adición de citocininas; BA (10.0, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1 y 0.0 mg·l⁻¹), kinetina (10.0, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1 y 0.0 mg·l⁻¹), 2-ip (10.0, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1 y 0.0 mg·l⁻¹) y el testigo. Para este ensayo se evaluó únicamente *D. imperialis*

Cuadro 3. Tratamientos para determinar el efecto de citocininas en tallos y hojas de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1997.

Tallo			Hoja		
BA	Kinetina	2-ip	BA	Kinetina	2-ip
10.0 mg·l ⁻¹	10.0 mg·l ⁻¹	10.0 mg·l ⁻¹	10.0 mg·l ⁻¹	10.0 mg·l ⁻¹	10.0 mg·l ⁻¹
3.0 mg·l ⁻¹	3.0 mg·l ⁻¹	3.0 mg·l ⁻¹	3.0 mg·l ⁻¹	3.0 mg·l ⁻¹	3.0 mg·l ⁻¹
1.0 mg·l ⁻¹	1.0 mg·l ⁻¹	1.0 mg·l ⁻¹	1.0 mg·l ⁻¹	1.0 mg·l ⁻¹	1.0 mg·l ⁻¹
0.3 mg·l ⁻¹	0.3 mg·l ⁻¹	0.3 mg·l ⁻¹	0.3 mg·l ⁻¹	0.3 mg·l ⁻¹	0.3 mg·l ⁻¹
0.1 mg·l ⁻¹	0.1 mg·l ⁻¹	0.1 mg·l ⁻¹	0.1 mg·l ⁻¹	0.1 mg·l ⁻¹	0.1 mg·l ⁻¹
0.0 mg·l ⁻¹			0.0 mg·l ⁻¹		

En este caso se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos factores (citocininas y tipo de tejido), en donde resulta 32 tratamientos, con 10 repeticiones en por tratamiento. En este caso se evaluó la formación de callo en un lapso de 30 días, así como el porcentaje de oxidación. Las mediciones fueron hechas, considerando un parámetro arbitrario establecido, en tallo fue para crecimiento de callo, en donde 0= nulo, 1= poco, 2= mediano, 3= grande y 4= muy grande. Y para hoja se evaluó la formación de callo, la escala dentro del parámetro fue: 1= nula, 2= pequeña, 3= mediana y 4=grande. Por utilizar valores cualitativos, los datos, en ambos casos se analizaron con el método no paramétrico de kruskal-Wallis, dicho análisis de varianzas fue sobre los datos de la escala establecida en las variables.

3.3.3.4. Prueba con estructuras florales

Para este ensayo se requirió de botones florales los cuales se presentan en los meses de octubre y noviembre, en donde se probó la posibilidad de formar callo (desdiferenciación) y/o organogénesis/embriogénesis partiendo de lígulas y botones florales. Para la siembra de lígulas se utilizaron botones que empezaban a mostrar color (a punto de abrir) en cambio para botones florales estaban completamente cerrados y compactos, tanto enteros como partidos a la mitad. Dado los niveles de oxidaciones obtenidos hasta ahora en los tejidos, se adicionó carbón activado ($10.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y antioxidantes ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido cítrico, $75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido ascórbico y $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de L-cisteina) para contrarrestar la oxidación, además se agregó $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA, por los resultados obtenidos del ensayo de citocininas, para favorecer la división celular y por tanto la formación del callo.

Debido a los diferentes tipos de flor en *D. excelsa*, se utilizó flor ligulada y tubuligulada, por lo tanto, los explantes para esta especie fueron: *D. excelsa*,

botones florales (BF), lígula (L) y tubulígula (TU). Para *D. imperialis*, como únicamente presenta flor ligulada, por lo que los explantes fueron lígula (L) y botones florales (BF). El tamaño de lígula en ambos casos fue de 2.0 a 2.5 cm. En tanto que para tubulígula fue de 1.5 a 2.0 cm., en ambas especies representado en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos para determinar la presencia de desdiferenciación en estructuras florales y efecto de agentes antioxidativos en *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Mex. 1997.

T1: <i>D. imperialis</i> + antiox. BF	T1: <i>D. excelsa</i> + antiox. BF
T2: <i>D. imperialis</i> + carbón BF	T2: <i>D. excelsa</i> + carbón BF
T3: <i>D. imperialis</i> + antiox. L	T3: <i>D. excelsa</i> + antiox. L
T4: <i>D. imperialis</i> + carbón L	T4: <i>D. excelsa</i> + carbón L
	T5: <i>D. excelsa</i> + antiox. TU
	T6: <i>D. excelsa</i> + carbón TU

BF= botones florales; L= lígula; TU= tubulígula.

El diseño utilizado en este ensayo fue completamente al azar con 6 tratamientos *D. excelsa* y 4 para *D. imperialis*. En todos los casos con 10 repeticiones. Las variables respuestas evaluadas fue progreso de la oxidación y formación de callo.

3.3.3.5. Pruebas de hojas en diferentes etapas de desarrollo

Este ensayo se realizó en enero de 1998 y los explantes utilizado fueron obtenidos bajo condiciones de invernadero como se explicó anteriormente. El objetivo era conocer si existe alguna diferencia en cuanto a la capacidad de desdiferenciación de las hojas hacia callos, influenciado por el estado de desarrollo de la planta.

Se sembraron de ambas especies dos tipos de hojas; procedentes de plantas maduras y de plantas jóvenes (*D. excelsa*, brotes reciente y *D. imperialis*

de plántulas), El medio utilizado fue MS, con la adición en cada explante de carbón activado (10 mg·l⁻¹) o antioxidantes (100 mg·l⁻¹ de ácido cítrico, 75 mg·l⁻¹ de ácido ascórbico y 50 mg·l⁻¹ de L-cisteína), para reducir la oxidación y 1 mg·l⁻¹ de BA en todos los casos para promover la formación de callo, los tratamientos se reportan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos evaluados, para conocer la influencia del nivel de desarrollo para la desdiferenciación y oxidación en hojas de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998.

	Especie	Explante	Control de oxidación
T1:	<i>D. excelsa</i>	+ madura +	carbón
T2:	<i>D. excelsa</i>	+ madura +	antioxidantes
T3:	<i>D. excelsa</i>	+ jóvenes +	carbón
T4:	<i>D. excelsa</i>	+ jóvenes +	antioxidantes
T5:	<i>D. imperialis</i>	+ madura	+ carbón
T6:	<i>D. imperialis</i>	+ madura	+ antioxidantes
T7:	<i>D. imperialis</i>	+ plántulas	+ carbón
T8:	<i>D. imperialis</i>	+ plántulas	+ antioxidantes

Todos los tratamientos fueron con 10 repeticiones. Se evaluó el nivel de oxidación y el tiempo en formarse el callo, así como su tamaño. El diseño experimental fue completamente al azar y analizado sobre los rangos del nivel de oxidación, los cuales fueron: 0= < 10%, 1= ≥10 < 30%, 2= ≥30 <60%, 3= ≥60 <90% y 4= ≥90%. En cambio para la formación de callo se utilizó la escala 0=nulo, 1=pequeño, 2=medio y 3=grande.

3.3.3.6. Incremento del nivel de antioxidantes y disminución del tiempo de desinfección

Este ensayo se realizó por los altos niveles de oxidación reportados hasta ahora en los ensayos realizados, principalmente en hojas y yemas. La presencia del fenómeno de oxidación, está influenciado por factores que producen estrés como la deshidratación e hiperhidratación, este último se presentó durante la

desinfección cuando el tejido esta en contacto con el agua, por lo cual se decidió reducir el tiempo a la exposición al agua.

Para contrarrestar un posible incremento de los niveles de contaminación, se aplicó Cuprimicin 500 a una concentración de 0.5 gr·l⁻¹ semanalmente en las plantas ubicadas en el invernadero antes mencionado.

En este ensayo se redujo el tiempo de exposición del tejido a la solución con cloro a 10 minuto, sin embargo la concentración del cloro activo fue de 2.5%, con 4 enjuagues con agua desionizada y esterilizada, en condiciones asépticas. El medio MS se le adicionó antioxidantes, en las cantidades siguientes: 100 mg·l⁻¹ de L-cisteína, 150 mg·l⁻¹ de ácido cítrico + 150 mg·l⁻¹ de ácido ascórbico. Los explantes probados fueron yemas laterales y hojas de partes recién brotadas.

Cuadro 6. Tratamientos para evaluar altos niveles de antioxidantes en yemas y hojas de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998

Especie	Explante	Control de oxid.
T1: <i>D. excelsa</i> +	yemas +	sin antioxidante
T2: <i>D. excelsa</i> +	yemas +	antioxidante
T3: <i>D. excelsa</i> +	hojas +	sin antioxidante
T4: <i>D. excelsa</i> +	hojas +	antioxidante
T1: <i>D. imperialis</i> +	yemas	+ sin antioxidante
T2: <i>D. imperialis</i> +	yemas	+ antioxidante
T3: <i>D. imperialis</i> +	hojas +	sin antioxidante
T4: <i>D. imperialis</i> +	hojas +	antioxidante

Las variables a evaluar en cada una de las dos especies fue el nivel y porcentaje de oxidación, así como el porcentaje de contaminación en cada explante. Para hojas se evaluó la inducción de callo y en yemas su crecimiento. El diseño experimental considerado para esta evaluación fue en completamente al azar con 10 repeticiones de cada tratamiento.

3.3.3.7. Efecto de BA y AIB

Se evaluaron yemas laterales y formación de callo en hojas. Los callos se obtuvieron de los ensayos anteriores, en la cual solamente se realizó un subcultivo. Dicho medio para callo se adicionó BA para promover la división celular.

Las mediciones hechas en este ensayo fueron para conocer la influencia de AIB y posible interacción con BA para la inducción de morfogénica y su efecto sobre el crecimiento de brotes laterales. Las respuestas evaluadas fueron crecimiento de yema y crecimiento de callo y la respuesta organogénica. En este caso se utilizaron 16 repeticiones de cada tratamiento y el diseño experimental fue completamente al azar.

Cuadro 7. Tratamientos para determinar el efecto de la presencia de citocininas (BA) y auxinas (AIB), en yemas y callos de *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998

T1	<i>D. excelsa</i>	callo	Sales 50%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T2	<i>D. excelsa</i>	callo	Sales 50%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 3.0 mg·l ⁻¹
T3	<i>D. excelsa</i>	callo	Sales 100%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T4	<i>D. excelsa</i>	callo	Sales 100%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 3.0 mg·l ⁻¹
T5	<i>D. imperialis</i>	callo	Sales 50%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T6	<i>D. imperialis</i>	callo	Sales 50%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 3.0 mg·l ⁻¹
T7	<i>D. imperialis</i>	callo	Sales 100%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T8	<i>D. imperialis</i>	callo	Sales 100%, BA 3.0 mg·l ⁻¹ , AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T1	<i>D. excelsa</i>	yemas	Sales 50%, AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T2	<i>D. excelsa</i>	yemas	Sales 50%
T3	<i>D. excelsa</i>	yemas	Sales 100%, AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T4	<i>D. excelsa</i>	yemas	Sales 100%
T5	<i>D. imperialis</i>	yemas	Sales 50%, AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T6	<i>D. imperialis</i>	yemas	Sales 50%
T7	<i>D. imperialis</i>	yemas	Sales 100%, AIB 0.3 mg·l ⁻¹
T8	<i>D. imperialis</i>	yemas	Sales 100%

3.3.3.8. Pruebas de AG₃ y Sulfato de adenina

Los objetivos y variantes de este ensayo se explican por separado (inciso a y b), para los callos, el objetivo era determinar la posible organogénesis, considerando que el AG₃ es termolabil y que puede perder hasta un 90% sus propiedades con una esterilización con calor, fue necesario esterilizar con un filtro de membranas millipore de 0.2 µm como se detalla mas adelante. Para las yemas laterales la esterilización del medio fue con autoclave como en las anteriores.

a). Prueba con callo. Para el caso de callos, el objetivo era determinar la posible organogénesis con la aplicaciones del ácido giberélico (AG₃: 5.0 y 10.0 mg·l⁻¹) y sulfato de adenina (25.0 y 50.0 mg·l⁻¹) mas el testigo, los callos evaluados fueron a partir de hojas y tomados de ensayos anteriores. Este ensayo se llevó acabo para las dos especies. Los tratamientos utilizado fueron:

Cuadro 8. Tratamientos para evaluar la influencia de AG₃ y sulfato de adenina sobre la organogénesis en callos de *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1989.

Especie	AG ₃ (mg·l ⁻¹)	Sulfato de adenina (mg·l ⁻¹)	Especie	AG ₃ (mg·l ⁻¹)	Sulfato de adenina (mg·l ⁻¹)
1: <i>D. imperialis</i>	Testigo		1: <i>D. excelsa</i>	testigo	
2: "	0.0	25.0	2: "	0.0	25.0
3: "	0.0	50.0	3: "	0.0	50.0
4: "	5.0	0.0	4: "	5.0	0.0
5: "	5.0	25.0	5: "	5.0	25.0
6: "	5.0	50.0	6: "	5.0	50.0
7: "	10.0	0.0	7: "	10.0	0.0
8: "	10.0	25.0	8: "	10.0	25.0
9: "	10.0	50.0	9: "	10.0	50.0

En este ensayo se utilizó frascos tipo gerber por el tamaño del callo y forma de preparación del medio, en cada frasco se depositó 15 ml de medio de cultivo. El diseño experimental para este ensayo fue completamente al azar con

diferentes número de repeticiones, en cada frasco fue colocado dos o tres callos dependiendo del tamaño, cada callo es considerado una repetición y fueron 4 frascos por tratamiento. La variable respuesta fue la presencia de organogénesis con la formación de brotes vegetativos y/o radicales.

Esterilización con filtro millipore. Se esteriliza el medio en un matraz Erlenmeyer, cubriendo la boca con papel aluminio, sin haber agregado el AG₃. Se agrega el AG₃ con el filtro en ambiente estéril proporcionado por una campana de flujo laminar, se mezcla bien y vacía a los frascos o cajas esterilizadas que normalmente son de boca ancha para facilitar el vaciado y evitar la solidificación.

b). Yemas. El objetivo de este ensayo fue determinar si existe algún efecto del AG₃ y/o sulfato de adenina en el crecimiento de brotes. El medio de cultivo utilizado fue MS, adicionado con BA 3.0 mg·l⁻¹. Se evaluaron ambas especies y los tratamientos fueron:

Cuadro 9. Influencia de sulfato de adenina y AG₃, sobre el crecimiento de yemas laterales en *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998.

1:	<i>D. imperialis</i>	+ Sulfato de adenina 50 mg·l ⁻¹ y AG ₃ 3.0 mg·l ⁻¹
2:	<i>D. imperialis</i>	-----
3:	<i>D. excelsa</i>	+ Sulfato de adenina 50 mg·l ⁻¹ y AG ₃ 3.0 mg·l ⁻¹
4:	<i>D. excelsa</i>	-----

Cada tratamiento fue con 16 repeticiones y el diseño experimental fue completamente al azar, las variables respuestas que se tomaron fue el tamaño y número de brotes a partir de la yema lateral. Se evaluaron en ambas especies.

3.3.3.9. Tratamiento para enraizamiento

Una vez obtenidos las respuestas del efecto de AIB y AG₃, sobre los brotes, se llevó acabo el tratamiento para la inducción de raíces. Los tratamientos evaluados tanto para *D. excelsa* como para *D. imperialis*, son las siguientes:

Cuadro 10. Tratamientos para inducir enraizamiento en brotes *Dahlia imperialis* y *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998.

T1:	sales al 50%, 0.5 mg·l ⁻¹ AIA
T2:	sales al 50%, 0.2 mg·l ⁻¹ AIA
T3:	sales al 50%
T4:	sales al 50%, 1.0 mg·l ⁻¹ AIB, 1.0 mg·l ⁻¹ BA, sin carbón
T5:	sales al 50%, 0.1 mg·l ⁻¹ ANA
T6:	sales al 50%, 0.5 mg·l ⁻¹ ANA
T7:	sales al 100%, carbón activado
T8:	sales al 100%, sin carbón activado
T9:	sales al 50%, con carbón activado
T10:	sales al 50%, 1.0 mg·l ⁻¹ BA, 1.0 mg·l ⁻¹ AIB, con carbón activado
T11:	sales al 100%, 0.5 mg·l ⁻¹ AIA
T12:	sales al 100%, 1.0 mg·l ⁻¹ AIA

El diseño experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones en cada tratamiento, la variable repuesta fue el número y longitud de raíz, así como presencia de callo en la base.

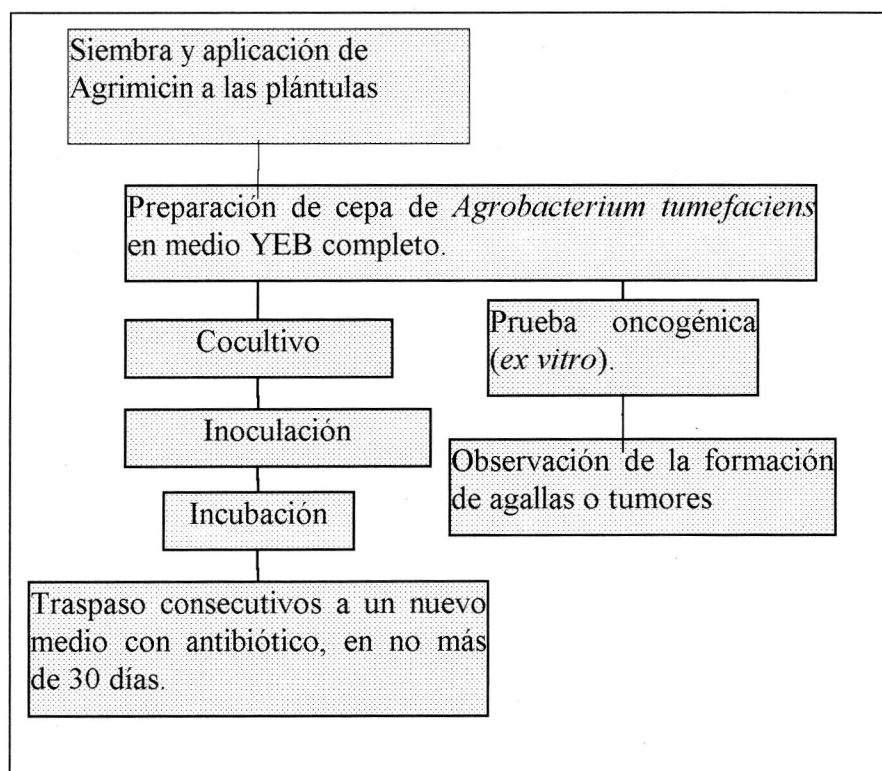
3.4. Aplicación de *Agrobacterium tumefaciens*

La bacteria empleada fue *A. tumefaciens*, la cepa especifica utilizada fue pTlc58, con marcador genético NPTII, el cual se obtuvo del cepario del CINVESTAV-Irapuato, las particularidades de su manejo son consideradas en el apartado correspondiente.

Esta fase se realizó en el mes de agosto de 1998 y todo el proceso fue realizado en las instalaciones del CINVESTAV de Irapuato. En este ensayo se utilizaron hojas de plantas jóvenes, los cuales se sembraron en los invernaderos antes mencionados en el mes de junio de 1998. La metodología de inoculación con *A. tumefaciens* fue con el método de Horsch et al. , ya que es la más adecuada para este tipo de tejido (Dra. Alba E. Jofre y Garfias: comunicación personal). En esta fase se realizaron diferentes actividades, como lo representa el siguiente cuadro:

Para conocer el grado de infectabilidad y/o la agresividad de esta cepa en un tejido específico, fue sometida a una prueba *ex vitro*, llamada prueba oncogénica, la cual se explicará más adelante.

Cuadro 11. Actividades realizadas para evaluar el efecto de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* *in vitro* y *ex vitro*, en tejido de dalia arborescentes CINVESTAP-Irapuato, Méx. 1998.



3.4.1. Cepa bacteriana

La bacteria empleada fue *Agrobacterium tumefaciens*, la cepa específica utilizada fue pTlc58, con marcador genético NPTII, el cual se obtuvo del cepario del CINVESTAV-Irapuato, las particularidades de su manejo son consideradas en el apartado correspondiente.

3.4.2. Preparación de medio para la cepa de *A. tumefaciens*

Primero se prepara el medio de cultivo para la cepa, el cual es un medio líquido denominado YEB (Yeast Extract B). Para garantizar la pureza de la cepa a utilizar, fue necesario aplicar un agente selectivo, en este caso un antibiótico (rifampicina), que se agregó 5 µm por cada 5 ml de medio, la aplicación fue con una jeringa, sin la utilización de filtro porque el antibiótico se comercializa en frascos sellados y esterilizados, únicamente se utilizó una jeringa estéril y en ambiente aséptico.

Después de la inoculación, se incubó por 24 horas a una temperatura de 28 °C, con agitación orbital y en condiciones de oscuridad.

Cuadro 12. Medio de cultivo específico YEB (Yeast Extract B) para *Agrobacterium tumefaciens*. CINVESTAP-Irapuato, Gto. 1989.

Estracto de carne	5.0 g·l ⁻¹
Estracto de levadura	1.0 g·l ⁻¹
Bacto peptona	5.0 g·l ⁻¹ .
Sacarosa	5.0 g·l ⁻¹
Ajustar el pH a 7.2 con NaOH.	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (1M)	2.0 ml
Agar	18.0 g·l ⁻¹

La concentración de la bacteria en el medio YEB fue aproximado, pero uniforme ya que se inoculó una vez con el asa bacteriológico. Pasadas las 24

horas de incubación, de este medio se tomó con una jeringa estéril 0.5 ml para la inoculación a las hojas o cocultivo y 0.5 ml para la prueba oncogénica, cada uno se disolvieron en 2 ml de agua estéril y desionizada.

3.4.3. Inoculaciones *in vitro* y *ex vitro*

i) Prueba oncogénica. De las plántulas llevadas de Chapingo a Irapuato, se tomaron 10, de las cuales 9 fueron inoculadas con la bacteria, tanto en hojas como en tallo, la bacteria fue la misma que se obtuvo anteriormente, junto con el testigo se incubó a 25°C y con un fotoperiodo de 15 horas. En este ensayo se evaluó la formación tumor en hojas o tallo, así como las reacciones de hipersensibilidad en un lapso de 4 semanas. La inoculación no se requirió de condiciones estériles, ya que las plantas inoculadas están en un sustrato no completamente estéril.

ii) Cocultivo

•Proceso de desinfección del material vegetal para el cocultivo

Desinfección del material (hojas)

-1ª Con alcohol al 70% por un minuto, después en cloro al 1% por 10 minuto, seguido por tres enjuagues en condiciones asépticas con agua deionizada y esterilizada.

-2ª HgCl_2 al 0.2%, por 10 min. al vacío, utilizando mascarilla (para evitar aspirar el olor por ser cancerígeno), posteriormente en condiciones asépticas se enjuagó 5 veces con agua deionizada y esterilizada

Cocultivo. El objetivo de esta etapa fue infectar las hojas y permitir la inserción de un gen contenido en esta bacteria, se utilizaron el primer (sencillo) y segundo (trifoliadas) par de hojas. El ensayo se realizó en un medio MS sin

antibiótico (Claforan®=cefatoxima). El procedimiento para la inoculación fue en condiciones asépticas, en donde del medio preparado en el inciso a, se pinchó la hoja (previamente desinfectada) poniendo en contacto la bacteria con el tejidos; el pinchado de hojas, es una por una e inmediatamente fue depositado en la caja de petri conteniendo el medio y se incubó por 24 horas a 25°C.

3.4.4. Siembra y efecto de *A. tumefaciens*

Dada las características que confiere la bacteria a los tejidos, el medio, para observar las reacciones, debe ser sin hormonas. Para el traspaso de los tejidos infectados se utilizó un medio básico MS con las sales al 100%, en donde se le adicionó un antibiótico (Claforan®) 500 mg·l⁻¹ en condiciones estériles. Este antibiótico elimina a la bacteria, pero la información genética se implantó, como se mencionó anteriormente *A. tumefaciens* es solo un vehículo de transporte. El cambio de un nuevo medio se realizó en 30 días o si la bacteria empezaban a formar colonias. En el nuevo medio se adicionaba la misma concentración de Claforan® para la eliminación definitiva de la bacteria. Las condiciones de incubación fueron en la sala correspondiente a 25°C, con 1300 lux por 16 horas.

En este caso se evaluó la apariencia de los tejidos como; amarillamiento, necrosamiento, formación de callo, raíz o brote. Los ensayos fueron con 20 repeticiones. Se emplean únicamente hojas, sin embargo fueron en plántulas, en hoja sencilla y trifoliada.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Observaciones generales

Por los altos índices de contaminación presentada en los diferentes ensayos, principalmente de explantes obtenidos en campo, no es recomendable obtener material vegetal bajo estas condiciones. Se observó principalmente colonias de bacteria en los medios de cultivo, en proporción mayor en yemas y ápices, lo cual puede estar asociado con una contaminación de bacteria sistémica, con el que sin una aplicación adecuada de un bactericida, los niveles son altos. El traspaso de las plantas de campo a condiciones de invernaderos, redujo los niveles de contaminación, lo que indica que no existen condiciones ideales de diseminación como el polvo, lluvias e insectos, además el control fitosanitario en estas condiciones es más efectivo.

4.2 Prueba de explantes

Las primeras observaciones hechas en estas especies, fueron relacionadas con la sensibilidad a deshidratación e hiperhidratación, además se determinó la susceptibilidad a la oxidación de los diferentes explantes.

Deshidratación. Las dos especies evaluadas presentan una alta susceptibilidad a este fenómeno, ya que el tiempo transcurrido para transportar el material del campo agrícola al laboratorio del Departamento de Fitotecnia, fue suficiente para que se presentara la deshidratación, la cual se manifiesta por una pérdida de turgencia principalmente en hojas y en brotes tiernos, a pesar de que el corte del material fue temprano, antes que la temperatura fuera alta.

Hiperhidratación. La hiperhidratación se observó durante el proceso de desinfección por el contacto del tejido con el agua, manifestándose con aspecto acuoso y semitransparente, con tonalidades oscuras. Es más común en hojas y partes jóvenes, dicho fenómeno puede enmascarar la presencia de oxidación, ya que la coloración acuosa en menos de una semana presenta una oxidación total, Torres (1989) indicó que durante la esterilización de los tejidos se forman polifenoloxidasas y triosinasas, originando un oscurecimiento, el cual coincide con las tonalidades presentadas en los tejidos de dalias hiperhidratadas.

Oxidación. El comportamiento para ambas especies en respuesta a la oxidación en cualquier explantes es muy similar, Figuras 2 y 3, en donde existen diferencias a los 8 días entre los explantes. Los porcentaje de oxidación en ápices y hojas son mayores que en tallos, peciolo y yemas laterales. En un estudio para determinar los contenidos de fenoles en tejidos de dalias, Martiñon (1998) encontró que existen diferencias en los contenidos de fenoles entre hojas y tallos, por lo que la susceptibilidad a oxidación son diferentes, siendo de 3.7 mg·g⁻¹ y 4.6 mg·g⁻¹ para tallo y 30.1 mg·g⁻¹ y 10.0 mg·g⁻¹ en hojas, de *D. imperialis* y *D. excelsa*, respectivamente. Además los contenidos de ligninas en tallos son mayores y evitan la oxidación, ya que son estructuras de soporte y más tolerantes a este fenómeno. Santos (citado por Martiñon, 1998) mencionó que el oscurecimiento de los tejidos involucra reacciones enzimáticas catalizadas por el complejo de enzimas llamadas polifenoloxidasas, lo anterior indica que actúan múltiples enzimas para que se presente la oxidación.

Las hojas se sembraron en trozos de 0.5 a 1.0 cm², los cortes efectuados para obtención de estos tamaños fomentó el estrés e inició el proceso de oxidación, Torres (1989) mencionó que el tamaño inicial del explante no es normalmente crítico, aunque la proliferación puede fallar si el tamaño del explante está por debajo del crítico, esto depende de la especie ya que la presencia de polifenoloxidasas y triosinasas se activan inmediatamente después

de un corte, sin embargo este autor no considera la obtención de un tamaño mediante cortes, los cuales ocasionan un estrés y activación de estas enzimas.

En yemas apicales la oxidación se inicia durante la siembra, en donde se presentó durante el corte, un líquido rojizo producto de oxidaciones de compuestos fenólicos como fitoalexinas y flavonoides, Salisbury y Roos (1994) mencionaron que estos compuestos suelen concentrarse en zonas apicales y manifestarse con tonalidades oscuras, y además que los estos mismos autores mencionan que las cumarinas, los cuales tienen un mismo origen que los fenoles, se originan cuando la planta experimenta lesiones o en senescencia, fomentando la oxidación. Pierik (1994) mencionó que un corte en tejido puede emanar un líquido oscuro y muy tóxico como producto de oxidación de fenoles y quinonas. Por lo que los ápices sembrados además del corte que fomenta el estrés, existe oxidaciones de los altos índices de fenoles, taninos y quinonas, se observó para el primer día una oxidación del 100% del tejido, en 80 % de los explantes.

A las 4 semanas de realizado el ensayo, los niveles mas bajos de oxidación se presentan en tallos y peciolos aunque con tendencia hacia un incremento, en esta fecha las yemas laterales presentaron un promedio de oxidación del 50%, sin que presenten crecimiento las yemas, indicando que el medio de cultivo empleado no existe un proceso de inducción. Los tallos y peciolos son tejidos mas lignificado y presentan niveles bajos de fenoles y taninos Martiñon (1998), en un estudio enzimático en tejidos de dalias, encontró que la concentración de fenoles en tallo es menor que en hojas, además los tallos tienen mayores concentraciones de ligninas, por lo que en estos tejidos presentaran los menores porcentajes de oxidaciones.

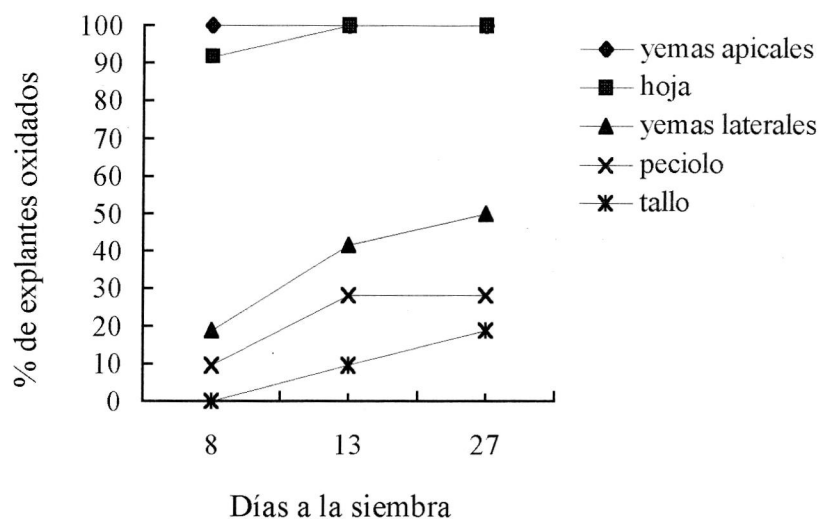


Figura 2. Presencia de oxidación en diferentes explantes de *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1997.

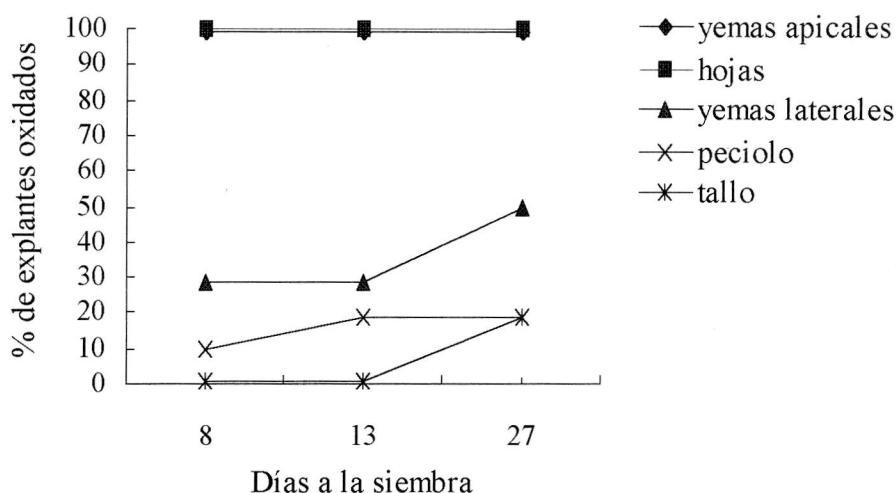


Figura 3. Presencia de oxidación en diferentes explantes de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997.

Las figuras anteriores indican que a 8 días, la presencia de oxidación en tallo y pecíolo es menor del 10%, para yemas apicales es del 100% indicando una gran diferencia en susceptibilidad a la oxidación. En tallos, en 15 días presentó un crecimiento de callo blanquecino y desagregado, que emerge de las lenticelas sin formar una estructura compacta, en pecíolos ocasionalmente

pueden presentar dicho crecimiento, aunque es mucho menor que en tallo, los tallos extraídos de las partes más jóvenes fue menor este crecimiento, lo cual está determinado por la propia distribución de lenticelas en la planta, ya que se concentra más en partes mas desarrolladas del tallo y menos en las partes jóvenes.

Las dos especies de dalias evaluadas resulta evidente que los mejores explantes para buscar organogénesis (yemas apicales y hojas) presentaron índices de oxidación muy altos, en hojas fue determinante el tamaño (0.5 a 1.0 cm²) y los cortes efectuados en dicho explante, en tanto que los ápices presentaron los índices más altos de actividad fenólica y enzimas oxidativas. Murashige (1974) mencionó que la mayoría de las especies vegetales presentan una mayor totipotencia en yemas apicales, laterales y hojas, el mismo autor menciona que la mayoría de las especies de la familia Helianthiaceae, como gerbera, crisantemo, girasol, etc. utilizan yemas apicales, laterales o botones florales como sistema de regeneración. Mientras que Wei *et al.* (1990) indicaron que puede lograrse una inducción de brotes de dalias comerciales (*D. pinnata* Cav.) utilizando una rebanada de tallo con una yema lateral, sin embargo, este autor no mencionó la presencia de crecimiento de callos en las lenticelas en el trozó de tallo. En ambas especies evaluadas, los mejores explantes (yemas apicales y hojas) presentaron índices de oxidación muy altos.

4.3 Prueba de antioxidantes

Los explantes evaluados mostraron una misma tendencia en la presencia de oxidación comparado con el ensayo anterior. Los tratamientos de remojar los explantes para remover los fenoles y taninos resultó contradictorio por la presencia de hiperhidratación en la mayoría de los explantes probados, este daño fue más severo en hojas y yemas apicales, en tanto que en tallo, peciolo y yemas laterales fue menor.

La hiperhidratación se presentó durante la desinfección por el contacto del tejido con el agua, Martiñon (1998) reporta valores altos de peroxidasa y fenoles en hojas de dalias arborescentes, además Fric (1981) indicó que los contenidos de fenoloxidasas en cloroplastos, mitocondrias y en general en el citoplasma son altos, lo anterior indica que en hojas fácilmente puede presentarse estas enzimas ocasionando un descontrol de la membrana que no permite un intercambio diferencial y una regulación de la entrada de agua ocasionando este fenómeno. Además la hiperhidratación enmascara la oxidación, ya que dichos tejidos a los 8 días están completamente oxidados.

Las evaluaciones de estos tratamientos fue a las 3 semanas, sin embargo en yemas apicales el efecto puede ser observado en menos de 24 h, ya que la oxidación se presenta inmediatamente por una gran actividad de fenoles.

Tratamientos. El tratamiento de remojar por 12 horas los explantes (T1) y por 4 horas (T2), se observó daños por el fenómeno de hiperhidratación, dañando la mayoría de los explantes probados, este daño es más severo en hojas y yemas apicales, por lo que la incidencia de la oxidación en estos explantes resultaron mayores. A los 5 días, la mayoría de los explantes en el tratamiento T1 y T2 estaban oxidados (Figura 4 y 5).

Los mejores tratamientos, en ambas especies fue con carbón activado (T3) y medio líquido (T4), reportados en la figura 4 y 5, los cuales presentan diferencia estadística ($P \leq 0.05$), sin embargo los valores promedio de estos dos tratamientos son altos; en *D. imperialis* en T3 fue de 2.08 a y T4 de 2.03 a, mientras que para T1 y T2 fue 3.50 b y 3.06 b respectivamente, indicando que los tratamientos probados influyen de manera diferente en el control de oxidación en los explantes. Los datos anteriores indican que el carbón activado y medio líquido pueden reducir o atenuar los índices de oxidación, Pierik (1995) mencionó que el carbón activado absorbe y retiene sustancias relacionadas con

la oxidación, también menciona que un medio líquido no permite la concentración de sustancias tóxicas en un solo punto del medio de cultivo, ambos factores influyeron para la reducción de la oxidación en estos tratamientos.

Explantos. Las dos especies presentaron una oxidación en ápices del 100% (figura 4 y 5) y en cualquiera de los tratamientos, dicho fenómeno se presentó durante el corte, en donde existe un exudado color marrón/negro, generalmente polifenoles y taninos que dificultan el crecimiento y desarrollo del explante, como se mencionó anteriormente.

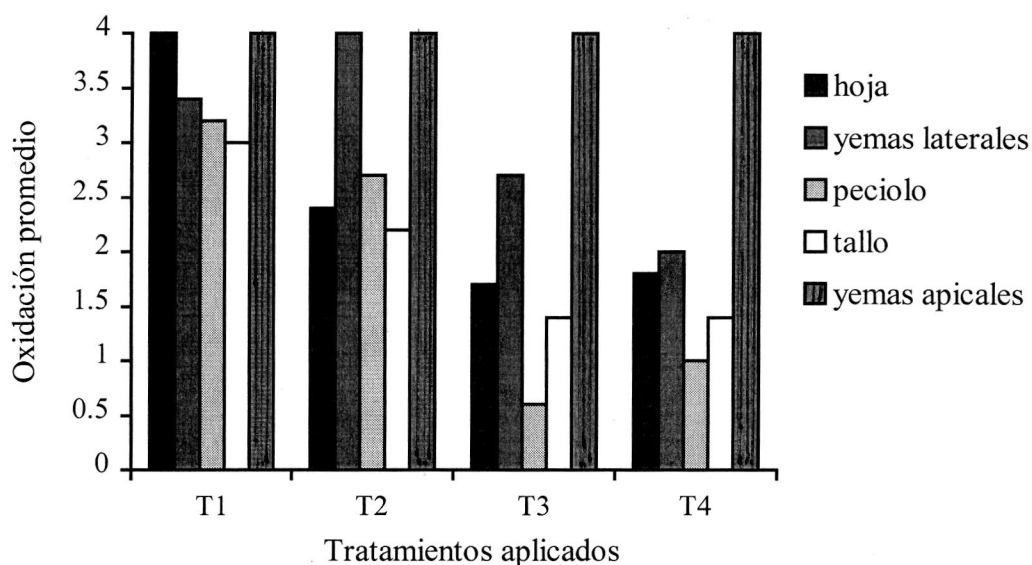


Figura 4. Promedio de las oxidaciones presentadas en los explantes evaluados en *D. imperialis*. Chapingo, Méx. 1997. Escala de medición establecida 0= < 10%, 1= ≥ 10 < 30%, 2= ≥ 30 < 60%, 3= ≥ 60 < 90% y 4= ≥ 90 %. Chapingo, Méx. 1997.

Donde:

T1= Remojar en agua corriente por 12 horas + antioxidantes en el medio; T2= Remojar en agua con antioxidante por 6 horas; T3= carbón activado 10 g·l⁻¹; T4= medio líquido.

Los explantes con menor incidencia de oxidación fueron peciolo y tallos, a los 12 días se observó un crecimiento de callo desagregado como en el ensayo anterior. En hojas en crecimiento (sin extenderse totalmente) y maduras (todos los foliolulos extendidos), pero de plantas maduras, se tienen diferentes respuestas; el primer caso es más susceptible a hiperhidratación y el segundo más susceptible a oxidación u oscurecimiento de la venación en toda la hoja, finalizando con una oxidación, Torres (1989) mencionó que los problemas de oxidación son menores en tejidos jóvenes que en tejidos maduros ya que contiene menos taninos e hidroxifenoles.

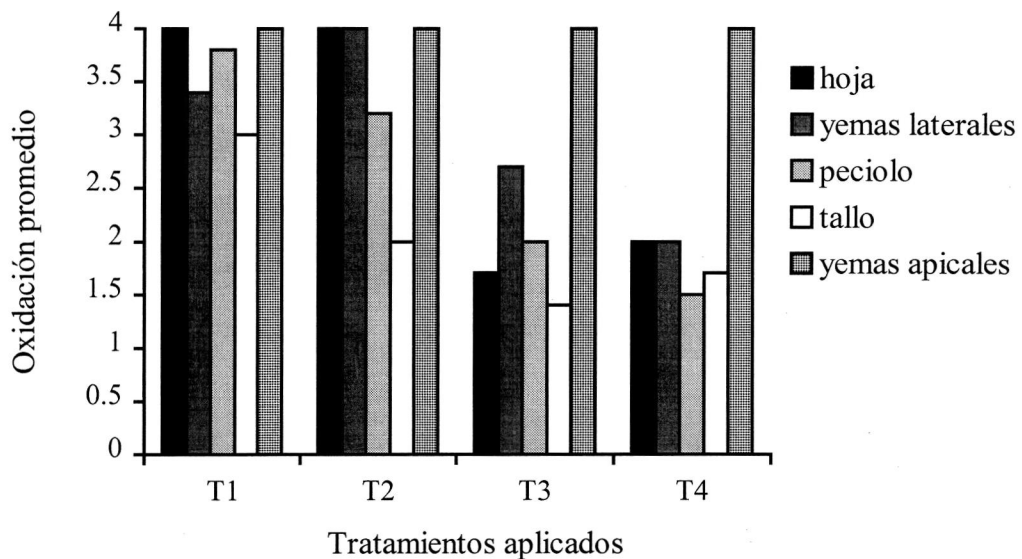


Figura 5. Promedio de las oxidaciones presentadas en los explantes evaluados en *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. Escala de medición establecida 0= < 10%, 1= ≥ 10 < 30%, 2= ≥ 30 < 60%, 3= ≥ 60 < 90% y 4= ≥ 90 %. Chapingo, Méx. 1997.

Donde:

T1= Remojar en agua corriente por 12 horas + antioxidantes en el medio; T2= Remojar en agua con antioxidante por 6 horas; T3= Carbón activado 10 g·l⁻¹ en el medio y T4= medio líquido.

Contaminación. Principalmente por bacterias y hongos, presentando mayores índices en los tratamientos con enjuague (T1 y T2), se incrementa por

el contacto con el agua, ya que las bacterias y algunos hongos encontraron condiciones ideales para invadir los tejidos, comparados contra los que no se remojaron (T3 y T4) en cualquiera de los explantes probados. El promedio por tratamiento fue; T1 de 80%, T2 de 70% , T3 de 40 % y T4 de 45 %, en los dos primeros casos los explantes que presentaron mas repeticiones sin contaminación, correspondieron a tallos y peciolo, debido a que son tejidos más lignificados.

4.3.1 Concentraciones de carbón activado y sales del medio

Las respuestas obtenidas en este ensayo corresponden a las 3 semanas de establecido el ensayo, existe una disminución de oxidación en los tratamientos aplicados comparados con el caso anterior. Sin embargo, los datos indican que existe un efecto igual para las diferentes concentración de sales y la presencia de carbón activado (Cuadro 13), Murashige (1978) y Pierik (1994) mencionaron que el carbón activado disminuye las oxidaciones en tejidos, en este ensayo no se observó dicho efecto, debido a rapidez con que se presenta este fenómeno y en gran proporción que el efecto del carbón activado no es visible, además las enzimas oxidativas de fenoles se activan durante la siembra haciendo el fenómeno irreversible.

Las respuesta de los tejidos mostraron diferencias significativas, corroborando los resultados obtenidos en los apartados 4.2 y 4.3. En el análisis estadístico de los datos no presentó interacción, porque la oxidación de los explantes siguen un comportamiento similar en cualquier tratamiento evaluado. Los mejores explantes fue tallo y peciolo, mientras que las yemas apicales y hojas presentaron valores más altos (Cuadro 14).

Cuadro 13. Medias de oxidación en los diferentes tratamientos evaluados en *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997.

Tratamientos	<i>D. imperialis</i>
T1: 100% sales	1.94 a ^z
T2: 50% sales	2.06 a
T3: 100% sales + carbón act.	2.12 a
T4: 50% sales + carbón act.	2.10 a

^zLos valores con la misma letra no son significativamente diferente ($P \leq 0.05$). Escala de medición de oxidación; 0= < 10%, 1= ≥ 10 < 30%, 2= ≥ 30 < 60%, 3= ≥ 60 < 90% y 4= $\geq 90\%$.

Cuadro 14. Medias de oxidación en los diferentes explantes evaluados en *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997.

Explantos	<i>D. imperialis</i>
Yemas apicales	3.90 a ^z
Hojas	2.32 b
Yemas laterales	1.70 bc
Pecíolo	1.35 c
Tallo	1.00 c

^zLos valores con la misma letra no son significativamente diferente ($P \leq 0.05$). Escala de medición de oxidación para determinar la severidad; 0= < 10%, 1= ≥ 10 < 30%, 2= ≥ 30 < 60%, 3= ≥ 60 < 90% y 4= $\geq 90\%$.

La Figura 5 muestra que el tratamiento con los valores más bajos de oxidación fue en T1, sin embargo los mas uniformes y más bajos los tenemos en el tratamiento T4. En la misma figura indica los niveles más bajos de oxidación en hojas se presentaron en los tratamientos T3 y T4 (sales al 100 y 50%, con carbón en los dos casos), en cambio para yemas laterales los niveles más bajo fueron en T1 y T2 (sales al 100 y 50%, en ambos sin carbón), la presencia de carbón activado no influyó significativamente en la adsorción de pigmentos tóxicos, sustancias inhibitorias, fenoles y taninos o el tiempo en producirse estos pigmentos fue muy rápido que no permite que actúe ningún agente de control. La influencia de bajas concentraciones de sales tampoco influyó significativamente, ya que los datos son muy similares. Los más bajos niveles de oxidación se presentaron en el T1 (Cuadro 13), sin embargo, si observamos los explantes dentro de este tratamiento podemos observar que esto fue debido a

que los datos para tallo fue muy bajo, consecuentemente la media fue baja. Pierik (1990) mencionó que *Gerbera* y *Rhododendron* son sensibles a altas concentraciones de sales respondiendo con un incremento en los niveles de oxidación. En este ensayo existe una ligera respuesta de los explantes, las hojas presentan ligera disminución de oxidación con carbón activado en cambio para yemas laterales los índices de oxidación son menores sin la presencia de carbón activado (Figura 6).

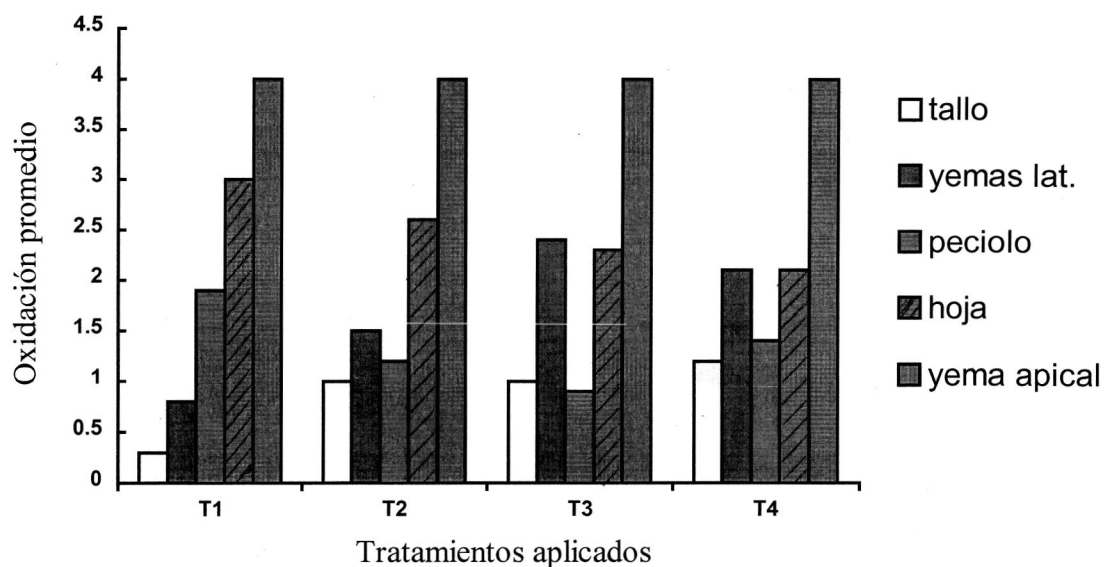


Figura 6. Medias de la oxidación en los tipos de explantes de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997.

Donde: T1= sales al 100%, T2= sales al 50%, T3= sales al 100% + carbón activado $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, T4= sales al 50% + carbón activado $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

En estas dos evaluaciones (apartados 4.3 y 4.3.1) resultaron los explantes más adecuados el tallo y peciolo. En este último ensayo los niveles de oxidación en yema laterales son bajos y no existen diferencias significativas entre el tallo y peciolo como se muestra en el Cuadro 14. Sin embargo el crecimiento en tallos y peciolo corresponde a un callo muy desagregado y sin consistencia que puede emerger de las lenticelas, lo que dificulta la formación de un callo verdadero y

la formación de brote. Aunque estas respuestas en tallo pueda deberse a un control hormonal interno, que hasta ahora no se ha probado.

Los altos índices de oxidación reportados hasta este momento indica que puede influir tanto el manejo previo a la siembra como los componentes de un medio para disminuir los efectos de este fenómeno, sin embargo el promedio de oxidación de los explantes de mayor interés (yemas y hojas) esta en los niveles más alto dentro de la escala establecida (1 a 4).

4.4. Prueba con citocininas

La respuesta obtenidas en los dos explantes evaluados, indica que el BA, 2-ip y kinetina causan un efecto diferente en la inducción de callo en hojas y tallos (Figura 7 y 8). En ambos explantes la mejor citocinina fue BA comparados con kinetina y 2-ip, en trabajos realizados por Karim y Hamidah (1992) encontraron que *Cineraria chinensis* (Helianthaceae) responden mejor a la formación de callo con kinetina en concentracionesdosis bajas que con BA, en tanto Ganapathi y Nataraja (1993) reportaron que en *Guizotia abyssinica* (Helianthaceae) la respuesta entre kinetina y BA es similar, lo anterior nos indica que dentro de la familia taxonómica las respuestas a esta hormona son muy variable.

El análisis estadísticos de los datos de las diferentes concentraciones de BA no muestran diferencias significativas (con $P \leq 0.05$), ni para el testigo, ya que en todos los casos muestra crecimiento de callo tanto en las hojas (Figura 9), como en tallo (Figura 9). En una evaluación visual se observó que los tratamientos con tamaño mayor de callo en hoja fueron con 0.1 y 3.0 mg·l⁻¹, y para tallo los tratamientos con mayores crecimiento fueron en las dosis altas (Figura 7). La aplicación de BA, kinetina y 2-ip no cambio el patrón de crecimiento de los tallos, ya que siguen siendo el mismo que se mencionó

anteriormente de callo desagregado, aunque la presencia de BA incrementa ligeramente el vigor comparado con 2-ip y kinetina, en ningún caso se formaron callos compactos en tallos.

Por las respuestas de la aplicación de BA en ambos explante, indica que el BA si fomenta citocinesis, como lo mencionaron Salisbury y Ross (1994). En el testigo, pudo existir las condiciones adecuadas de luz o la presencia de citocininas endógenas que favorecieron dicha respuesta, ya que Horgan (1984; citado por Salisbury y Ross, 1994), reportó en tabaco, la presencia de citocininas induce división celular en la parte medular del tallo aun sin aplicación externa.

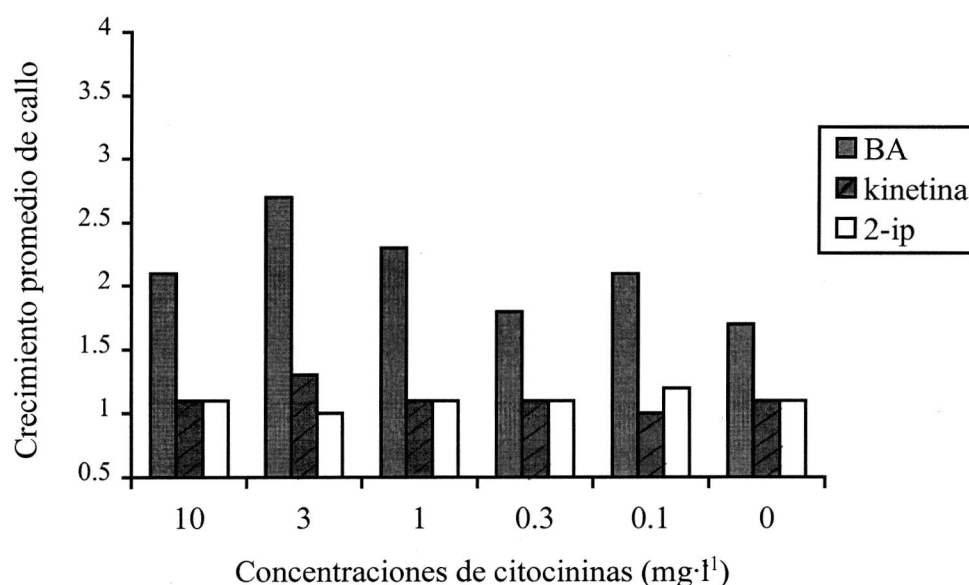


Figura 7. Promedio del efecto de citocininas evaluada en hojas de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997. Escala arbitraria establecida para la medición de formación de callo en hojas; 1= nula, 2= pequeña, 3= mediana y 4= grande.

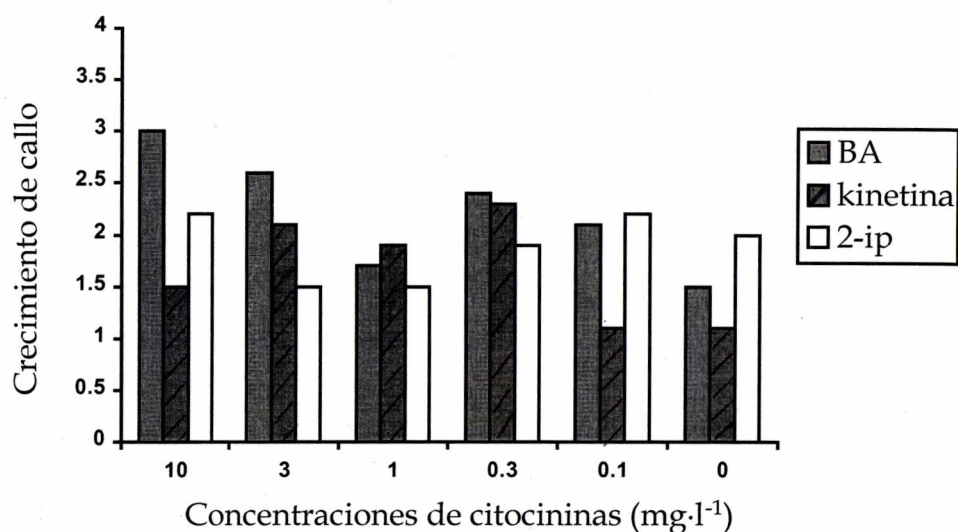


Figura 8. Promedio del efecto de citocininas evaluadas en tallo de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997. Escala arbitraria para medición de crecimiento de callo en tallo; 0= nulo, 1= poco, 2= mediano, 3= grande y 4= muy grande.



Figura 9. Efecto de las diferentes concentraciones de BA sobre la formación de callo en hoja de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1997.

Las respuestas en tallos evidentemente es favorecida por la presencia de citocininas, principalmente por BA en concentraciones altas, sin que esta diferencia sea tan notoria como en hojas. El tipo de crecimiento encontrado en callo es poco útil, sin embargo haciendo una comparación de las observaciones de este crecimiento contra los medio sin reguladores (discutidos anteriormente), se observa un cambio en el vigor de crecimiento, el que causa un efecto más favorable es el BA, aunque esta variación fue menos evidente en 2-ip y kinetina. Actualmente no existen reportes que indiquen que en este género exista la formación de callos compactos u organogénesis a partir de tallos.

4.5 Prueba con estructuras florales

Botones florales. Los resultados observados a los 12 días en botones florales enteros indican un 100% de oxidación, para cualquiera de las dos especies. En los tratamientos donde se evaluaron botones cortados a la mitad, en menos de 8 días mostraban un 100% de oxidación, estos datos indican que los agentes antioxidativos empleados en el medio de cultivo, no tuvieron ningún efecto para contrarrestar dicho fenómeno en estos tejidos y dada la presencia tan temprana de la oxidación, no se observó efecto por la adición del BA, no podemos afirmar que causa o no efecto en estructuras florales. En trabajo realizado por Hernández y Mejía (1994) reportaron que en *D. variabilis* es posible tener una desdiferenciación de botones florales y diferenciación a brotes vegetativos, los mismos autores reportan los resultados en tres meses de incubación. En este ensayo en menos de 15 días los botones florales presentaban una oxidación del 100%, tiempo que no fue suficiente para observar el fenómeno de desdiferenciación, mucho menos la rediferenciación de estos tejidos.

Con los tratamientos probados no fue posibles lograr una formación de callos a partir de botones florales, la primera limitante fue la oxidación u

oscurecimiento del tejido. Esta oxidación se asoció al grado de desarrollo de los botones, ya que se sembraron botones bien formados y de tamaños de 0.6 a 1.2 cm, en donde los niveles de fenoles y tanino es alto, Torres (1989) mencionó que los tejidos maduros es más común la oxidación que en tejidos jóvenes debido al incremento en las concentraciones de fenoles e hidroxifenoles.

La diferencia en el tiempo en presentarse la oxidación entre botones enteros y mitades, indica que el daño que causar los cortes efectuados para la división del botón influye en la presencia de este fenómeno, aún cuando se adicionó antioxidante en el medio y la parte cortada estuvo en contacto directo con el medio de cultivo, por lo que el estrés por el corte activa de manera inmediata la oxidación de fenoles ya que en estas estructuras presentan altos niveles de fenoles y taninos, Salisbury y Roos (1994) indicaron que fenoles y cumarinas se forman cuando una plantas es lesionada o en senescencia, en tanto que Torres (1989) reportó que la necrosis u oxidación resulta de la acción de varias enzimas como polifenoloxidasas y triosinasas, formadas debido a lesiones durante el corte de un tejido, De hecho el contenido de fenoles en botones es alto, por eso se observó la oxidación en poco tiempo, sin embargo bajo una lesión las diferentes enzimas se activan inmediatamente confirmando que efectivamente estas estructuras tienen muchos fenoles y compuestos similares que son muy oxidativos.

Lígulas (flores liguladas). En *D. excelsa* a los 5 días, se observó un 70% de las lígulas oxidadas totalmente, en tanto que el 30% presentó un ligero color amarillo en la base, aunque todas las repeticiones presentan la parte distal totalmente oxidada. Los datos reportados en la Figura 10, corresponden a una duración de 3 semanas en donde el 100% de las lígulas y tubulígulas estaban oxidadas. En esta figura la diferencia en cuanto al tiempo en presentarse la oxidación en los dos tipos de explantes, es por el daño en la manipulación de extracción de las tubulígulas, ya que las lígulas son más sencillas de extraer.

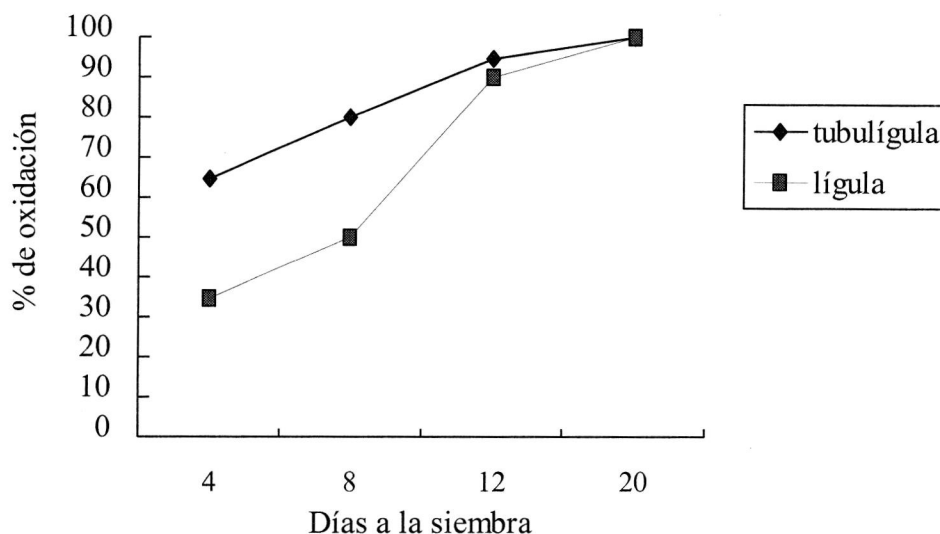


Figura 10. Progreso de la oxidación en lígulas y tubulígulas en *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1997.

En *D. imperialis*, como en este caso se evaluó únicamente lígulas, a los 5 días presentó el 90% de oxidación y contaminados el 40%, en 12 días, el 100% estaban oxidados (Figura 11), en ninguna repetición se formó callo. Existe una pequeña diferencia en el tiempo en presentarse la oxidación entre carbón activado y presencia de antioxidantes para las mismas fechas evaluadas, sin embargo ambas llegan a tener un 100% en menos de 15 días. Después de 15 días no se observó indicio de formación de callo en los diferentes tratamientos. En ambas especies se presenta el fenómeno de oxidación desde la siembra, sin embargo se sabe que la sala de incubación se registraron temperaturas mayores de 28°C, lo que pudo haber influido en la manifestación de este fenómeno, al igual que en los ensayos anteriores, ya que Wang *et al.* (1988) en ensayos hechos con dalias comerciales encontró que la temperatura de incubación es de 25°C en brotes de *D. pinnata*.

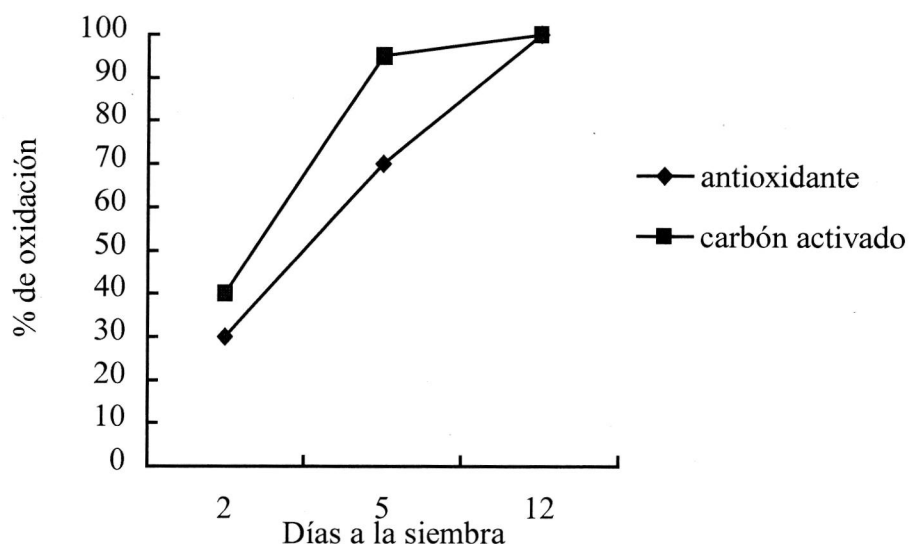


Figura 11. Progreso de la oxidación en lígulas de *Dahlia imperialis*. Chapingo, M x. 1997.

4.6. Incremento del nivel de antioxidantes y disminución del tiempo de desinfección

Este ensayo, se realizó debido a los altos niveles de oxidación reportados en los ensayos anteriores y en los tejidos de mayor interés (hojas y yemas). En estos explantes, las respuesta obtenidas hasta ahora no son uniformes ni constantes.

Los resultados indican que los altos niveles de antioxidantes ( cido cítrico 150 mg l⁻¹, ácido ascórbico 150 mg l⁻¹ y l-cisteina 100 mg l⁻¹) probados en hojas y yemas laterales reducen los niveles de oxidación. En las hojas donde inicia con el corte y continua como una mancha oscura, puede ser atenuada y bajar los promedios de oxidación (Figura 12), comparados con los resultados del apartado 4.2 en donde se obtuvieron porcentajes de oxidación de 100 y 50% en hojas y yemas, respectivamente, en *D. excelsa*. En este ensayo para la misma

especie en hojas presentó el porcentaje máximo de 25% con antioxidantes en el medio de cultivo, por lo que la aplicación de ácido cítrico 150 mg·l⁻¹, ácido ascórbico 150 mg·l⁻¹ y l-cisteína 100 mg·l⁻¹ reduce los índices de oxidación, Torres (1989); Salisbury y Ross (1994) mencionaron que sustancia como el ácido cítrico y ácido ascórbico, son efectivos para modificar el potencial redox y disminuir la susceptibilidad de los tejidos a la oxidación. Por lo anterior es posible utilizar estos porcentajes de antioxidantes sin que se tenga una respuesta negativa, ya que disminuye en hojas y yemas laterales los porcentajes de oxidación, sin que exista una aparente efecto dañino.

Los tratamientos sin antioxidantes influyó el manejo empleado, el cual fue de 10 minuto en agua clorada para la desinfección, tiempo que fue insuficiente para la activación masiva de enzimas relacionadas con la hiperhidratación, ya que Torres (1989) reportó que durante la desinfección se activan enzimas como fenoloxidasas y triosinasas principalmente por el contacto con agua y surge daños a los tejidos asociados con este fenómeno el cual favorece la oxidación. Si comparamos los resultados de este ensayo 60 y 35% en hojas y yemas respectivamente (Figura 12), con los resultados del ensayo 4.3. es evidente que en este ensayo los porcentajes de oxidación son más bajos asociados por la disminución del tiempo de exposición al agua para la desinfección, Burdon y Marshall (1983) mencionaron que el ataque o lesión de un patógeno incrementa enzimas como glucosa-fosfato deshidrogenasa, fosfatasa, peroxidasa y polifenol oxidasa, las cuales están asociadas con la oxidación y considerando que el contacto del agua con el tejido en tiempos muy corto puede iniciar hiperhidratación es claro que pueden surgir este tipo de enzimas y fomentar la oxidación, sin embargo por el tiempo corto este no llega ser muy alto.

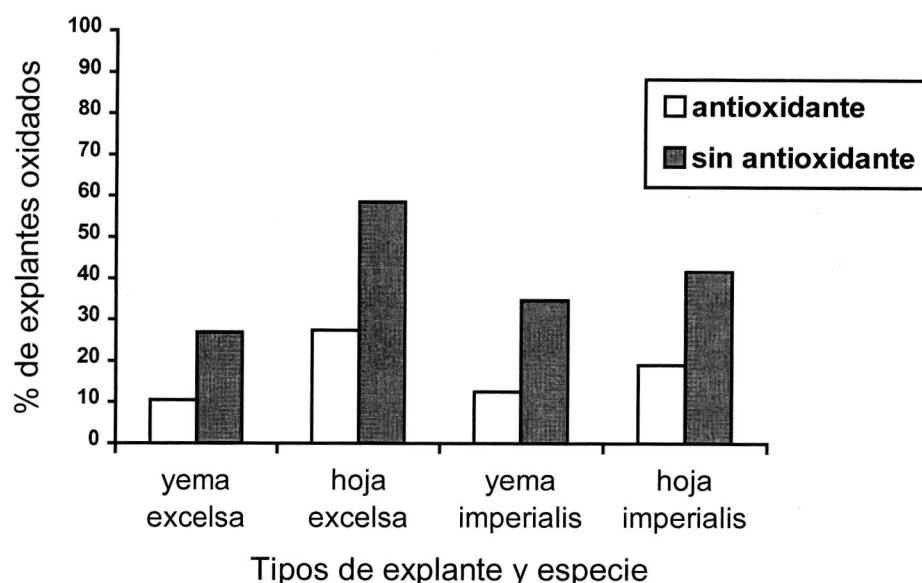


Figura 12. Influencia de antioxidantes en un medio MS y disminución del tiempo de exposición al desinfectante en hojas y yemas laterales en *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis* sobre el porcentajes de oxidación. Chapingo, Méx. 1998.

La figura anterior nos indica que no es suficiente utilizar un solo método para bajar los niveles de oxidación en los tejidos de ambas especies, lo anterior indica que para garantizar una respuesta favorable de los explante por este fenómeno es necesario aplicar antioxidantes, mencionados anteriormente.

Los resultados que se observó al momento de la siembra es una disminución del daño ocasionado por hiperhidratación, por el hecho de haber expuesto menos tiempo los explantes al contacto con el agua, principalmente en hojas que presentaba los daño mayores, ya que no se activaron las enzimas encargadas de las oxidaciones o en cantidades suficientes para tener efecto visibles y aunque no podemos afirmar que los altos niveles de antioxidantes sean tóxicos, es evidente la reducción de la oxidación en los tejidos evaluados.

4.7. Pruebas en hojas de diferentes etapas de desarrollo

Oxidación. Los resultados reportados para conocer la influencia de la etapa de desarrollo o edad de un tejido sobre los promedios de oxidaciones, los cuales fueron más altos en hojas maduras en cualquiera de los tratamiento, siendo más evidente en la especie *D. imperialis*, lo que indica que los tejidos provenientes de plántulas son menos susceptibles a oxidarse, ya que los tratamientos T6 y T8 existe una reducción de los porcentaje de oxidación y no de rebrotes como *D. excelsa* (Figura 13) en la misma figura, los tratamientos con antioxidantes presentaron las medias de oxidación más bajas T2, T4, T6 y T8 que los tratamientos con carbón activado en cualquiera de las dos especies.

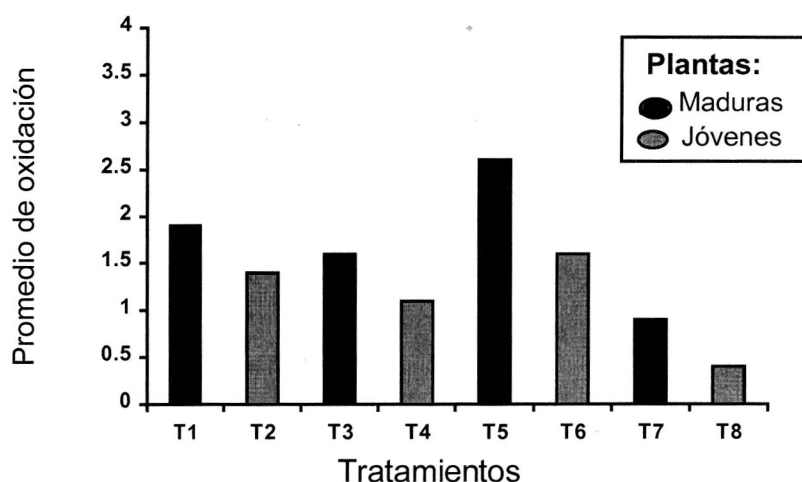


Figura 13. Efecto de la etapa de desarrollo, antioxidantes y carbón activado en hojas de *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis* sobre el promedio del nivel de oxidación. Chapingo, Méx. 1998. Escala de medición del grado de severidad de la oxidación, en base al porcentaje de tejido oxidado 1=0-30%, 2=30-60%, 3=60-90% y 4=>90%.

Donde: T1= *D. excelsa*, en planta madura + carbón activado; T2= *D. excelsa* en planta madura + antioxidantes; T3= *D. excelsa* en brote + carbón activado; T4= *D. excelsa* en brote + antioxidantes; T5= *D. imperialis* en planta madura + carbón; T6= *D. imperialis* en plantas madura + antioxidantes; T7= *D. imperialis* en plántula + carbón activado; T8= *D. imperialis* en plántula + antioxidantes.

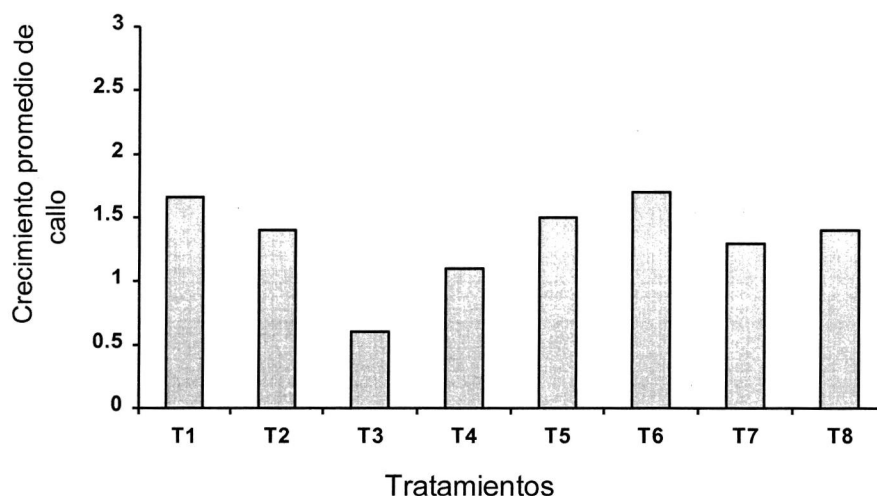


Figura 14. Efecto de la etapa de desarrollo sobre la inducción de callo en hojas de *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1998. Escala para medir crecimiento; 1= nula, 2=medio y 3=grande.

Donde: T1= *D. excelsa*, en planta madura + carbón activado; T2= *D. excelsa* en planta madura + antioxidantes; T3= *D. excelsa* en brote + carbón activado; T4= *D. excelsa* en brote + antioxidantes; T5= *D. imperialis* en planta madura + carbón; T6= *D. imperialis* en plantas madura + antioxidantes; T7= *D. imperialis* en plántula + carbón activado; T8= *D. imperialis* en plántula + antioxidantes.

4.8. Efecto de AIB y BA

Callos. Los resultados del efecto de la interacción de auxinas y citocininas en la organogénesis y citocinesis se tomaron a las dos meses de establecido el ensayo. En donde los tratamientos aplicados para evaluar el crecimiento del callo, no causaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$), por lo que bajo estas condiciones altas o bajas de AIB, en combinación con 3 mg·l⁻¹ de BA tuvieron un incremento igual en el tamaño de callos sembrado (Cuadro 15). Las medias en el cuadro 15 indican que no existe una respuesta diferente en el incremento del tamaño del callo de los tratamientos aplicados en las dos especies, aunque la media más alta fue 0.620 cm (tratamiento 100% de sales, BA 3 mg·l⁻¹, AIB 3 mg·l⁻¹

Callo. Los datos de formación de callo, corresponden a tres semanas, en esta fecha las hojas de plantas jóvenes empezaban a formar callo, contrario a las hojas de plantas maduras que empezaron en menos de dos semanas, indicando que esta inducción es más rápido en hojas maduras. Las hojas de plantas maduras a los 10 días de sembrado inicia un crecimiento intervenal que ocasiona que las hojas se vean arrugadas, el cual es el inicio del proceso de formación de callo o desdiferenciación de tejidos, este crecimiento se observa en toda la hoja, en cambio los explantes con etapas de plántulas (*D. imperialis*) y brotes tiernos (*D. excelsa*) forma un crecimiento de callo en la base de la hoja, donde esta en contacto con el medio de cultivo, el cual se observa 20 días después de sembrado, Salibury y Ross (1994) mencionaron que en embriones entre mas maduros en mas difícil el proceso de organogénesis, sin embargo no menciona el grado de desdiferenciación de un órgano que puede estar influenciado por el grado de desarrollo de los tejidos de conducción y porque los tejidos de plantas jóvenes aun están en crecimiento y no asimilan de igual forma el BA presente en el medio de cultivo.

El callo observado en tejidos de plantas maduras es muy irregular, con muchas porciones del tejido oxidado y no existe un crecimiento compacto en un solo lugar, comparado con el callo en hojas de plantas jóvenes, los cuales es un callos compacto en la base. Aunque los datos reportados en la Figura 14, muestra semejanza del efecto de BA, no existe una respuesta similar en cantidad y calidad de callos en un tiempo igual en ambos tipos de tejidos.

Los datos anteriores indican que es mejor la utilización de plántulas o material de rebrote comparado contra material obtenido de plantas maduras, principalmente por los niveles de oxidación, la utilización de altos niveles de antioxidantes actúan mejor en la reducción de la oxidación que el carbón activado, como se comentó en el ensayo anterior.

en *D. imperialis*) y el más bajo 0.125 cm (tratamiento sales 50%, BA 3 mg·l⁻¹, AIB 3 mg·l⁻¹ en *D. excelsa*).

Aún sin la diferencia estadística, los valores más altos los presenta *D. imperialis*. Y en esta misma especie, los valores de crecimiento más altos, están presentes en los medios de cultivo con 3 mg·l⁻¹ de AIB, indicando que concentraciones altas de AIB, tiene un pequeño efecto sobre la división celular y crecimiento en el tamaño de callo sembrado, sin embargo puede ser producto de la interacción BA con AIB.

En este ensayo los resultados relacionados con la organogénesis, indican que en ninguna repetición en las dos especies produjeron brotación de yema o raíz, por lo tanto la interacción AIB (3.0 mg·l⁻¹ y 0.3 mg·l⁻¹) con BA (3 mg·l⁻¹), no causa efectos organogénicos, pero tampoco se fomentó la oxidación de callos.

Cuadro 15. Interacción BA, AIB y sales del medio MS sobre crecimiento de callo originados de hojas en *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1998.

Tratamientos	Medias de crecimiento de callo (cm)
<i>D. excelsa</i> Sales 50% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 0.3 mg·l ⁻¹	0.340 a ^z
" Sales 50% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 3 mg·l ⁻¹	0.125 a
" Sales 100% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 0.3 mg·l ⁻¹	0.175 a
" Sales 100% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 3 mg·l ⁻¹	0.175 a
<i>D. imperialis</i> Sales 50% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 0.3 mg·l ⁻¹	0.300 a
" Sales 50% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 3 mg·l ⁻¹	0.500 a
" Sales 100% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 0.3 mg·l ⁻¹	0.371 a
" Sales 100% + BA 3 mg·l ⁻¹ + AIB 3 mg·l ⁻¹	0.620 a

^zValores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

Yemas. Para conocer las reacciones de las yemas en el crecimiento y brotación de raíz por la presencia de AIB, se tomaron los datos 25 días después de establecido el ensayo, el análisis de varianza de la respuesta sobre el crecimiento de yemas (Cuadro 16), indican que producen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados y la respuesta obtenida con porcentajes más altos fueron con sales al 100% en *D. excelsa*. Pero de manera general los datos indican que existe una disminución del tamaño del brote T1 T5 y T7 con la presencia de AIB, lo cual se asocia a una formación de callo en la base de los brotes sembrados los cuales demandan azúcares que podrían ser utilizados en el crecimiento del brote. De manera general los brotes de *D. excelsa* tiene un mayor crecimiento que *D. imperialis*, en la mayoría de los tratamientos, reportados en el Cuadro 16.

En cuanto a las combinaciones para saber en que tratamiento se obtuvieron los mejores crecimientos de brotes, tenemos que si existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre aplicar sales al 100% + AIB $0.03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (T3) en la especie *D. excelsa* contra todos los demás tratamiento evaluados, los datos mas bajos corresponden a sales al 50%, esta disminución pudo haberse dado por falta de minerales o su escasez, lo que influyó en el crecimiento, sin embargo no se formaron raíces con la reducción de minerales ni por la presencia de esta auxina.

Cuadro 16. Efecto de la concentración de AIB y sales del medio MS sobre el crecimiento de yemas laterales de dalia. Chapingo, Méx. 1998.

Tratamientos			Medias de crecimiento de yemas (cm)
T1: <i>D. excelsa</i>	Sales 50%, AIB 0.03 mg·l ⁻¹	2.57	b ^z
T2: "	Sales 50%	3.45	b
T3: "	Sales 100%, AIB 0.03 mg·l ⁻¹	6.30	a
T4: "	Sales 100%	2.78	b
T5: <i>D. imperialis</i>	Sales 50%, AIB 0.03 mg·l ⁻¹	1.00	b
T6: "	Sales 50%	2.32	b
T7: "	Sales 100%, AIB 0.03 mg·l ⁻¹	3.21	b
T8: "	Sales 100%	3.54	b

^zValores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

4.9. Pruebas de AG₃ y sulfato de adenina

Yemas. Los resultados obtenidos en este ensayo indican que la presencia de AG₃ y sulfato de adenina favorecen la brotación y crecimiento de yemas laterales en las dos especies, ya que los promedios presentados en el cuadro 17, así lo indican. Aunque la especie con los valores de crecimiento más altos fue *D. imperialis*, también se presentó crecimiento de yemas en las dos especies con el medio de cultivo sin AG₃ y sulfato de adenina. Los resultados obtenidos fueron con concentraciones muy bajas de AG₃, considerando que en la esterilización del medio se puede perder hasta un 90% de este regulador de crecimiento como lo indica (Pierik, 1994), por lo que con niveles bajos de AG₃ se obtienen crecimiento de yemas, Salisbury y Ross (1994) indicaron que plantas de chícharo pueden responden a cantidades tan pequeñas como 10⁻⁹ gramos (un nanogramo) de AG₃, Wei *et al.* (1990) reportaron que la utilización de 10.0 mg·l⁻¹ GA₃ + 50.0 mg·l⁻¹ de sulfato de adenina en un medio de cultivo MS en *D. pinnata*, se obtuvieron los mejores crecimiento de brotes, aunque también reportaron que

las variaciones entre cultivares es muy alta. Por lo que la diferencia de las respuestas en este ensayo entre las dos especie es interferida por concentraciones de hormonas endógenas, sin embargo, se obtienen crecimiento por aplicaciones de AG₃ y sulfato de adenina T1 y T3 (Figura 15).

Cuadro 17. Efecto de AG₃ y sulfato de adenina sobre el crecimiento de yemas laterales de *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo. Méx. 1998.

Tratamientos para yemas	Promedio de crecimiento (cm)
T1: <i>D. imperialis</i> medio MS + Sulfato de adenina 50 mg·l ⁻¹ + AG ₃ 3.0 mg·l ⁻¹	3.51 a ^z
T2: <i>D. imperialis</i> medio MS	1.35 bc
T3: <i>D. excelsa</i> medio MS + Sulfato de adenina 50 mg·l ⁻¹ + AG ₃ 3.0 mg·l ⁻¹	.54 ab
T4: <i>D. excelsa</i> medio MS	0.98 c

^zValores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

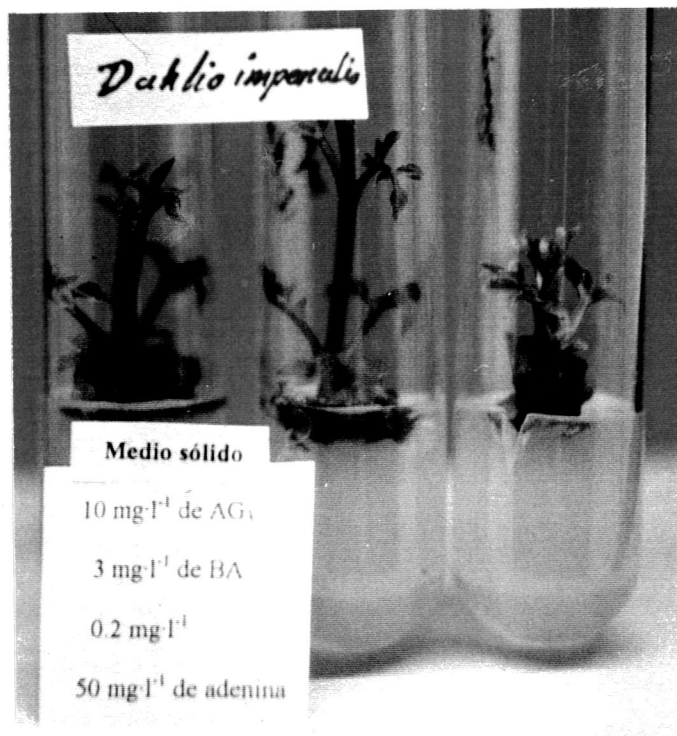


Figura 15. Efecto de AG₃ + sulfato de adenina, en un medio MS suplementado con 3.0 BA mg·l⁻¹ + 0.1 mg·l⁻¹ de ANA en *Dalia imperialis*. Chapingo, Méx. 1998.

Efecto en callos. En este ensayo se aplicaron altos niveles de AG₃, Estos tratamientos no causan un efecto diferente por la presencia del AG₃ y/o sulfato de adenina, debido a que no tenemos una respuesta organogénica. Los brotes obtenidos en los callos, no fue producto de la respuesta por la aplicación de los tratamientos 5 y 10 mg·l⁻¹ de AG₃, ya que dicha brotación se le asocia a un control hormonal interno de ese tejido, además, únicamente un solo callo presentó dicha organogénesis (Cuadro 18).

En concentraciones altas y bajas, se observa un crecimiento en el tamaño del callo, sin embargo este no necesariamente esta asociado con la presencia del AG₃ y/o sulfato de adenina, ya que en los testigos se observó este crecimiento, por lo que aplicaciones externas no incrementan directamente el tamaño del callo, pero los callos observado son más compactos*que los ensayos anteriores. De manera visual se observó que los callos tuvieron mejor crecimiento compacto en las concentraciones más altas de sulfato de adenina.

Cuadro 18. Efecto de AG₃ y Sulfato de adenina sobre organogénesis en *Dahlia excelsa* y *Dahlia imperialis*. Chapingo. Méx. 1998.

<i>D. imperialis</i>				
AG ₃ (mg·l ⁻¹)	Sulfato de adenina (mg·l ⁻¹)	Nº de callos sembrados	callo con brotes	tamaño de brote (cm)
0.0	0.0	9	0	0.0
0.0	25.0	7	0	0.0
0.0	50.0	7	0	0.0
5.0	0.0	12	0	0.0
5.0	25.0	10	0	0.0
5.0	50.0	8	0	0.0
10.0	0.0	10	1	0.5
10.0	25.0	9	0	0.0
10.0	50.0	7	0	0.0

<i>D. excelsa</i>				
AG ₃ mg·l ⁻¹	Sulfato de adenina (mg·l ⁻¹)	Nº de callo sembrados	Callo con brote	tamaño de brote (cm)
0.0	0.0	8	0	0.0
0.0	25.0	7	0	0.0
0.0	50.0	6	0	0.0
5.0	0.0	7	1	3.5
5.0	25.0	7	1	1.0
5.0	50.0	8	0	0.0
10.0	0.0	9	0	0.0
10.0	25.0	7	1 (3)	2.0, 1.5, 0.5
10.0	50.0	9	0	0.0

4.10. Tratamientos para enraizamiento

Los resultados obtenidos indican que existen diferentes factores que influyen para que se presente el efecto de los tratamientos aplicados, ya que los tratamientos probados indican que existe clara tendencia a la formación de raíces por la adición de AIA en un medio de cultivo MS en ambas especies. Los tratamientos con carbón activado tienen cierto efecto en la formación de raíces, este efecto es mas evidente en *D. excelsa*, también con sales al 50%, como se presentan en los Cuadros 19 y 20.

Como observamos en los Cuadros 19 y 20, el comportamiento de las dos especies es muy similar por efecto del AIA. Para la longitud de raíz, existe un pequeño incremento por concentraciones de 0.5 (T1 y T11) y 1.0 (T2) que de 0.1 mg·l⁻¹ de AIA. Para el número de raíces, los datos indican que tenemos una ligera tendencia hacia un incremento por la aplicaciones de sales al 100% (T11 y T12) con 0.5 y 1.0 mg·l⁻¹, respectivamente. Y la mayoría de los otros tratamientos sin esta hormona la formación y longitud, así como el porcentaje de brotes enraizados, presentaron niveles mas bajos principalmente en *D. excelsa*.

El efecto de los tratamientos con adición de carbón activado T10, T9 y T7, sobre la inducción de raíces, indica que es posibles este enraizamiento, Torres (1989) indicó que el carbón activado absorber sustancia tóxicas como los fenoles, que no permiten un crecimiento del explante, y Pierik (1994) mencionó que dificulta la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento en un medio de cultivo. Lo anterior hace suponer que los explantes expuestos a dichas condiciones primero tuvieron un lapso de restricciones, posteriormente generaron la concentraciones indispensables para formar raíz, Biran y Havely (1973) encontraron que en esquejes de *D. variabilis* las auxinas bajan de yemas y hojas a la base para formar raíz.

Los datos reportados para los tratamientos con carbón activado fue a los 35 días, fecha en que empezaron a notarse dicha respuesta, este tiempo es aproximadamente el doble comparado con los medios de cultivo con AIA, el cual fue de 15-20 días, además las raíces con el carbón activado fueron más delgadas pero más ramificadas.

En los tratamientos con menos respuestas positivas fueron con el T4 y T8 en donde para el primer caso se aplicó AIB y BA, en las dos especies no produjo ninguna raíz y para el segundo caso fue con un 100% de sales sin presencia de hormonas y tampoco produjeron raíces.

Cuadro 19. Respuesta promedio de brotes en *Dahlia imperialis*, a diferentes tratamientos para enraizar. Chapingo, Méx. 1998.

Tratamientos	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces (X)	Brotes enraizados (%)
T1	1.27 a ^z	2.50	60
T11	1.12 ab	4.75	40
T2	0.97 b	2.50	40
T12	0.62 b	4.00	50
T9	0.22 b	1.00	10
T10	0.10 b	1.00	10
T8	0.00 b	0	00
T4	0.00 b	0	00
T7	0.00 b	0	00
T6	0.00 b	0	00
T3	0.00 b	0	00
T5	0.00 b	0	00

^zLos valores con las mismas letras no son significativamente diferente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 20. Respuesta promedio de brotes de *Dahlia excelsa*, a diferentes tratamientos para enraizar, Chapingo, Méx. 1998.

Tratamientos	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces (X)	Brotes enraizados (%)
T1	1.51 a ^z	3.50	45
T12	1.50 a	7.50	50
T11	1.22 ab	5.00	60
T2	1.01 b	4.50	30
T7	0.72 bc	1.50	30
T9	0.46 c	3.00	10
T10	0.40 c	2.25	20
T6	0.35 c	1.00	15
T3	0.22 c	1.00	10
T5	0.20 c	1.50	10
T4	0.00 c	00	00
T8	0.00 c	00	00

^zLos valores con las mismas letras no son significativamente diferente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Donde: T1: sales al 50%, 0.5 mg·l⁻¹ AIA
 T2: sales al 50%, 0.2 mg·l⁻¹ AIA
 T3: sales al 50%
 T4: sales al 50%, 1.0 mg·l⁻¹ AIB, 1.0 mg·l⁻¹ BA, sin carbón
 T5: sales al 50%, 0.1 mg·l⁻¹ ANA
 T6: sales al 50%, 0.5 mg·l⁻¹ ANA
 T7: sales al 100%, carbón activado
 T8: sales al 100%, sin carbón activado
 T9: sales al 50%, con carbón activado
 T10: sales al 50%, 1.0 mg·l⁻¹ BA, 1.0 mg·l⁻¹ AIB, con carbón activado
 T11: sales al 100%, 0.5 mg·l⁻¹ AIA
 T12: sales al 100%, 1.0 mg·l⁻¹ AIA

Los tratamientos con aplicaciones de ANA, se observó que existe una formación del callo en las base de los brotes sembrados, aunque este crecimiento no es compacto, sin embargo esto incide en el crecimiento de los brotes, ya que a los tres semanas fueron los más grandes y vigorosos. Contrariamente ocurrió con la presencia de AIB y BA en donde se forma un crecimiento de callo en la base en un 90% de los brotes, sin que esto favorezca la formación de raíz o crecimiento de brotes. Los efectos de formación de callo en los brotes subcultivados se presentan a continuación:

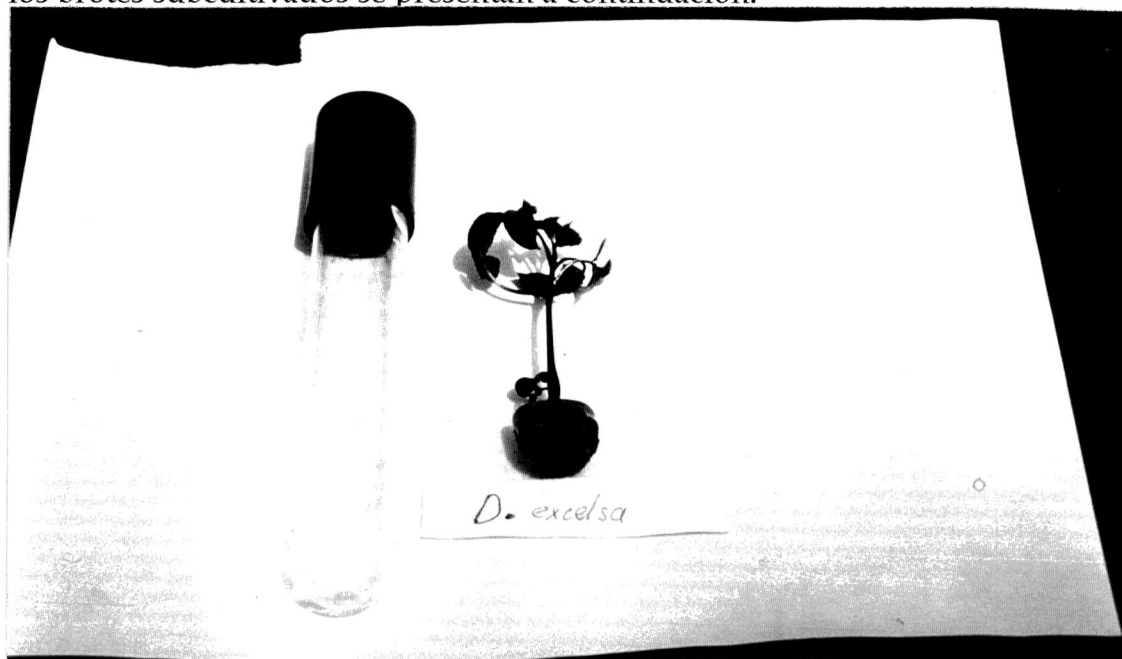


Figura 16. Efecto de la aplicación de AIA sobre enraizamiento de brotes subcultivados de *Dahlia excelsa*. Chapingo, Méx. 1998.

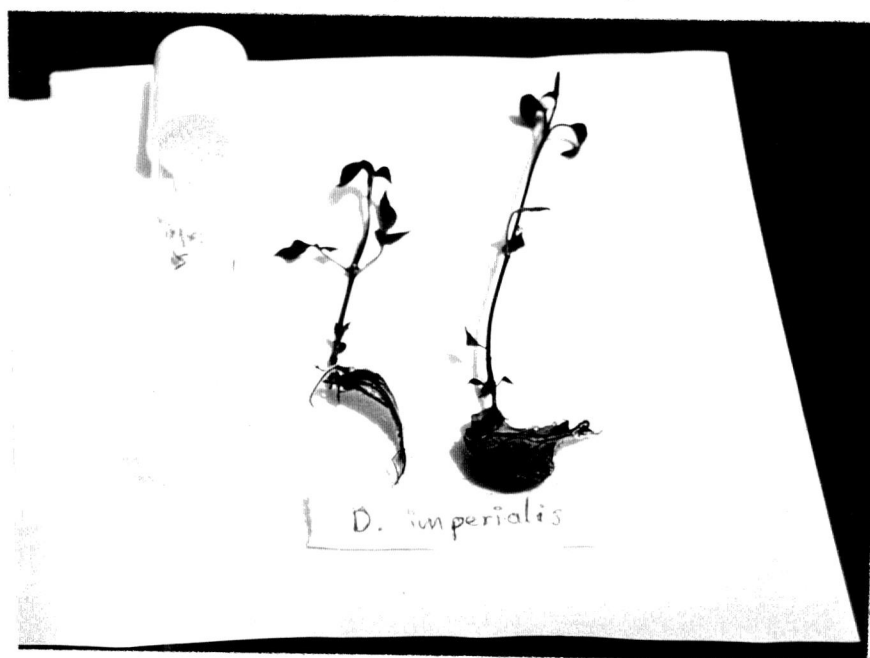


Figura 17. Efecto de AIA sobre enraizamiento de brotes subcultivados de *Dahlia imperialis*. Chapingo, Méx. 1998.

Las respuestas correspondientes a porcentajes de brotes enraizados, son muy bajos, ya que el máximo fue de 60% en medios con AIA, sin embargo en algunas repeticiones no se eliminaron completamente la presencia de citocininas, se debe eliminar completamente los restos de este regulador de crecimiento, como señaló Torres (1989) donde algunas especies requieren que los brotes estén completamente libre de citocininas, ocasionalmente puede ser acarreado de un traspaso y disminuir los niveles de enraizamiento, aunque pudo presentarse diferencias internas dentro de las dos especies probadas, ya que Biran y Havely (1989) indicaron que dentro de la especie *D. variabilis* los porcentajes varían mucho entre cultivares y entre etapas de desarrollo asociados con la concentración de auxinas internas.

4.11. Efecto de *Agrobacterium tumefaciens*

Prueba oncogénica. En esta prueba *ex vitro*, los datos fueron tomados a la cuarta semana de haber hecho la inoculación, no se observó crecimiento de callo en las zonas inoculadas, que fue en tallo y hojas de las plántulas, únicamente se observó una reacción de hipersensibilidad en los puntos de inoculación, ya sea por la presencia de bacteria o el daño físico por inoculación. De las 10 repeticiones, 2 plántulas número 4 y 7 se oxidaron, la repetición núm. 2 presentó la hoja inoculada sin cambio, las otras plántulas presentan las hojas inoculadas completamente secas. En tallo de las mismas plántulas no se observó ningún cambio en un periodo de 30 días, aunque si se observó la herida por la inoculación, para la integración de genes foráneos no es muy conocido, sin embargo Herrera-Estrella *et al.* (1983) indicaron una hipótesis, en donde la región T del ADN-T es separada del plasmido Ti en la cepa de *Agrobacterium*, durante el proceso de infección de la bacteria, como este gen entra sin la región T, entonces el hospedero debe proveer las funciones necesarias para efectuar la integración, de ahí que esta bacteria tenga un diferencial de agresividad entre las especies susceptibles, por lo tanto el proceso de inoculación debe ser menos agresivo para evitar daños físicos que influyan en la manifestación de la oncogenicidad de esta bacteria.

Cocultivo. Se observó que el tiempo empleado (24 h) para estar en contacto, la bacteria con el tejido, no causa un efecto sobre el nivel de oxidación, ni repercute en la eliminación de la cepa bacteriana presente, ya que en otras pruebas hechas para determinar el nivel de agresividad, regeneración y capacidad de infección de la cepa *Agrobacterium*, la regeneración es el tiempo para recolonizar un medio donde se ha perdido las propiedades del antibiótico Jofre (1998, comunicación personal) coincide con la aparición de la bacteria a los 25 días (Cuadro 21 y 22), ya que las colonias fueron visibles..

Oxidación. En este caso los niveles de oxidación fueron muy bajos, sin embargo cuando se desarrolla la bacteria debido a la pérdida de las propiedades bactericidas del Claforan, existen una proliferación rápida de la cepa inoculada, y por lo tanto el tejido infectado empieza a oxidarse. Además la disminución del nivel de oxidación esta dado por a la edad fenológica de la planta (resultados de ensayo 4.7) y por las condiciones de incubación ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) anteriormente discutidas.

Cuadro 21. Efecto de *Agrobacterium tumefaciens* sobre la inducción de raíces, formación de callo e incidencia de oxidación, en cotiledones de *Dahlia imperialis* a 28 días de inoculado, CINVESTAV-Irapuato, 1998.

Repeticiones	Número de raíz	Oxidación del tejido (%)	Contaminación o recolonización	Presencia de callo
Testigo	0	20	0	0
1	0	10	0	0
2	0	20	0	0
3	0	30	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	90	<i>A. tumefaciens</i>	0
7	0	0	0	0
8	0	70	(otra bacteria)	0
9	0	100	<i>A. tumefaciens</i>	0
10	0	100	<i>A. tumefaciens</i>	0

Cuadro 22. Efecto de *Agrobacterium tumefaciens* sobre la inducción de raíces, formación de callo e incidencia de oxidación, en hojas verdaderas de plántulas de *Dahlia imperialis* a 20 días de inoculado, CINVESTAV-Irapuato, 1998.

Repeticiones	Numero de raíz	Oxidación del tejido (%)	Contaminación o recolonización	Presencia de callo
Testigo	0	0	0	0
1	11	0	0-	0
2	15	0	<i>A. tumefaciens</i>	0
3	12	0	0	0
4	6	80	0	0
5	4	0	0	0
6	16	0	0	0
7	30	0	0	0
8	18	0	0	0
9	17	10	0	0
10	3	90	<i>A. tumefaciens</i>	0

El efecto asociado con la introducción de genes por parte de *A. tumefaciens*, en los tejidos inoculados es la inducción de enraizamiento. Los resultados obtenidos en la aplicación de esta bacteria es un incremento en la concentración de auxinas (AIA), manifestándose en un abundante enraizamiento que se obtuvo, comparado con el testigo, Salisbury y Ross (1994) mencionaron que si se desactiva por una mutación el gen de la isopentenil AMP sintasa, disminuyen los niveles de citocininas, por las funciones propias de este regulador, las agallas crecen con lentitud y los tejidos forman numerosas raíces por organogénesis. En este caso todas las raíces crecieron de la base de la hoja, pero no de los bordes, aunque estuvieran en contacto con el medio de cultivo, como indicaron Biran y Havely (1973) que en esquejes de *D. variabilis* las auxinas se acumulan en la base, los cuales descienden del ápice y de las hojas inmaduras.

Por los resultados anteriores y los datos reportados en el ensayo 4.9 y los reportes de Salisbury y Ross (1994) que mencionaron que el DNA-T contiene dos genes que codifica enzima que convierten triptofano en AIA, por lo que en

este ensayo, estos genes quedaron implantados en las células, generándose un incremento en la concentraciones de AIA y el efecto visible fue la gran proliferación de raíces en todas las repeticiones inoculadas (Cuadro 22), sin embargo en hojas cotiledonales no se obtuvo ninguna reacción de esta inoculación. Ahora bien, el hecho de que las raíces brotaran de la base indican que en esta parte hubo mayor concentración de AIA, los mismos autores indican que en el corte de una hoja de frijol y puesta en agua, sin nutrientes, en la parte basal se acumulan las auxinas, fenómeno que pudo presentarse en este caso.

Formación de callo. En este caso se observó ocasionalmente que en la base se originaban una especie de agalla (callo), principalmente en el punto de corte, en los trozos de hojas alejadas del foliolulo este efecto es menor. De los subcultivo del primer ensayo con *A. tumefaciens*, se tomaron trozos de raíces, lográndose la obtención de callos compactos, sin que presenten organogénesis, después de tres meses de incubación en un medio MS.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a las conclusiones siguientes:

- *D. excelsa* y *D. imperialis* son altamente susceptibles a hiperhidratación asociados con el contacto con el agua en el procesos de desinfección.
- Por los mejores resultados obtenidos en los bajos niveles de oxidación y formación de callos, son mejores los explantes provenientes de plantas jóvenes.
- Las dalias arborescentes presentan altos niveles de oxidaciones, principalmente en ápices, yemas laterales, botones florales, flores liguladas y hojas y en menor proporción en tallos y peciolo.
- Los altos niveles de oxidaciones solamente pueden ser atenuadas con la aplicaciones de antioxidantes; ác. cítrico 150 mg·l⁻¹, ác. ascórbico 150 mg·l⁻¹ y l-cisteína 100 mg·l⁻¹.
- Los mejores explantes para obtención de callos compactos fueron en hojas de plantas jóvenes, con la utilización de 1.0 -3.0 mg·l⁻¹ de BA.
- La presencia de AG₃ y sulfato de adenina favorecen la brotación y crecimiento de yemas laterales en las dos especies a una concentración de 3.0 mg·l⁻¹ de AG₃ + 50 mg·l⁻¹ de sulfato de adenina.

- El AIA a concentraciones de 0.5 y 1.0 mg·l⁻¹ en ambas especies produjo los mejores efectos para la inducción de raíz, tanto en porcentaje como en tamaño y número.

- La aplicación de *Agrobacterium tumefaciens*, *ex vitro*, no causa efecto oncogénico, únicamente una reacción de hipersensibilidad en los puntos de inoculación y el proceso de infección de la bacteria no ocurrió.

- El efecto visible de la inoculación con *Agrobacterium tumefaciens* fue la gran proliferación de raíces en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Aird, N. 1997. The Dahlia. American Dahlia Society. PO. box 266 Yellow Prings, Ohio. 1 p.
- Arcos, M. R.; E. Sierra M.; J. M. Mejía M.; C. Sosa-Moss. 1995. Descripción morfológica de estructuras florales en dalias arborescentes. Revista Chapingo Serie Horticultura 1: 63-66.
- Albouy, J. , Kusiak, C., Louanchi, M., Wang, W. 1994. Evaluation of rapid ELISA procedure for detecting viruses in propagation stock of pelargonium, dahlia and orchids. Acta Horticulturae 377: 189-195.
- Bonga, J. M. and Don . J. Durzan. 1987. Cell and tissue culture in forestry. Vol 1, General Principles and Biotechnology. Martilus Nijhoff Publisers. 422 p.
- Biran, I. and A. H. Halevy. 1973. Endogenous levels of growth regulators and their relationship to the rooting of dahlia cuttings. Physiology Plant. 28: 436-442.
- Burdon, J, J. and Marshall. 1983. Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. The use of isoenzymes in plant disease research. Elsevier Science publishers B. V. Amsterdam. pp. 402-404.
- Cunningham, P. 1998. Tree dahlias. Created for the Green Link Proyects Page. WWW.dahlia.com's. 1p.
- De la Peña G., C. A. 1995. La Dahlia (Acocoxochitl). V: Congreso Nacional de Horticultura Ornamental. Cuautitlan Izcalli, Estado de México. Programas y Resúmenes. Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental. 129 p.
- Departmente of Plant Pathology and Microbiology at. Texas A&M University; Texas Plant Disease Diagnostic Laboratory (DPPM). 1996. Dahlia: Pests and Diseases. For web site. [Http://cygnus.tamu.edu/Textlab/flowers/dahlia.html](http://cygnus.tamu.edu/Textlab/flowers/dahlia.html) 1 p.

- Elomaa, P. and T. Holton. 1994. Modification of flower color using genetic engineering. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 12: 63-68.
- Estrada A. 1996. Fenología. Cartago, La Unión Z. P. La Carpintera. Instituto Nacional de biodiversidad y Missouri Botanical Garden. Costa Rica. [Http://www.dahlia.com](http://www.dahlia.com) 1 p.
- Evans, E. 1998. Dahlias for the Home Lanscape. Extension Associate. Department of Horticultural Science. 2 p.
- Fell, D. 1995. Gardener's Library. Concept Development Associates, Inc. Extension Associate. Department of Horticultural Science, 480 p.
- Fessenden R. y Fessenden J. S. 1985. Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamericana. Impreso en México. pp. 884-885.
- Fric, F. 1981. Plant Phisyology Encyclopedia. Vol.14 Enzimas oxidativas. pp. 617-620.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climatica de Koppen, para adaptarlo a la Republica Mexicana. UNAM. México. 192. p.
- Gifford, R. M. and L. T. Evans. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Annual Review of Plant Physiology* 32:485-509.
- Jacobsen, J. V. and P. M. Chandler. 1990. Gibberellin and Absciscic Acid in Germinating Cereals. Edited by P. J. Davies. *Plant Hormones: and Their role in plant growth and development*. Kluwer Academic Publishers. pp. 164-170.
- Jorgenson, R. 1990. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *TibTech* 8:340-344.
- Hahlbrock, K. and H. Grisebach. 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 130-150.
- Hahlbrock, K. and D. Scheel. 1989. Physiology and molecular biology of phenilpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Hammet, K. 1980. *The World of Dahlias*. First published by A. H. and A. W. Reed Ltd. Wellington, New Zeland. 123 p.
- Heilenman, D. 1995. With gardeners nurturing and love, every dahlia has its day. Gannett News Service. The Detroit News.

- Hernández P. F. y J. M. Mejía. M. 1994. Micropopagación de dalia (*Dahlia variabilis* Cav.). Revista Chapingo Serie Horticultura 1: 63-66.
- Hernández, P. F. 1993. Cultivo de tejido de Dahlia (*Dahlia* spp). Tesis de Licenciatura. UPAEP. Escuela de Fitotecnia. Puebla, México. 93 p.
- Herrera-Estrella L. 1984. El sistema de plásmido Ti de la *Agrobacterium tumefaciens* y su empleo para introducir genes en células vegetales y plantas. Trabajo de revisión. Laboratorio de Genética. Ryksuniversiteit Gent. B-9000 Gent (Belgica). Interferón y Biotecnología, Vol. 1, No. 3, 1-14.
- Horsch , R. B. , J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1985. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. Biological Sciences, Monsanto Company, St Louis, Missouri 63167. Science. Vol. 227. pp. 1229-1231.
- Karim, A. G. abd and M. Hamidah. 1992. Effects of auxin and cytokinin on in vitro organogenesis of *Cineraria chinensis* L. Plant Biotechnology Laboratory. Universiti Kebangsaan Malaysia. Acta Horticulturae. Vol. 292. pp. 45-49.
- Kerrigan, J. 1992. Growing Dahlias. Ohio State University Extensión Factsheet. 2021 Coffey Rd., Columbus, Ohio. 1 p.
- Killingsworth, B. 1996. Fundamentos de la Dahlia. Sociedad Americana de la Dahlia. PO box 266 Yellowm Prings, Ohio. 45387. 4 p.
- Martín P. E. 1997. Desarrollo de sistema para la regeneración *in vitro* y transformación genética del limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y la mandarina (*C. reticulata*). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. Irapuato. Gto. Tesis Doctoral. Especialidad de Biotecnología en Plantas. pp. 31-58.
- Martiñon, M. A. S. 1998. Caracterización química de cuatro especies de Dalia (*Dahlia* spp.), por medio de isoenzimas, carbohidratos y fenoles. Chapingo, Méx. Tesis profesional. 87 p.
- Mejía M. J. M., Baltazar B. O. y Gens V. M. 1995. Banco de Germoplasma de dalias en México. V: Congreso nacional de Horticultura Ornamental. Cuautitlan Izcalli, Estado de México. Programas y resúmenes. Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental. 129 p.
- Murahige, T. 1974. Plant propagation though Tissue Culture. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:136-66.

- Pierik R. L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. (versión española de Luis Ayerbe Mateo-Sagasta). Departament of Horticulture, Agricultural University Wageningen, The Netherlands. 380 p.
- Pierik R. L. 1994. Biotecnología vegetal como herramienta en la horticultura ornamental. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 1: 45-57.
- Robinson, K. E. P. and E. Firoozabady. 1993. Transformation of floriculture crops. *Scientia Horticulturae* 55:83-99.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. Publicado en EUA. 630 p.
- Salmeron, D. J. 1981. Las flores y su cultivo. Ministerio de Agricultura. Madrid, España. 340 pp.
- Shatilo, V. I., Keldysh, M. A., Morozova and S. E. 1991. Hormonal induction of organogenesis in culturing isolated of dahlia. *Glavnyi Botanicheskii Sad, Moscow, Russia. Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada*. 159: 68-72.
- Shatilo, V. I., 1991. Some patterns of rhizogenesis in shoots of dahlia in vitro. *Glavnyi Botanicheskii Sad, Moscow, Russia. Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada*. 159: 72-75.
- Sponsel, V. M. 1990. Gibberellin Biosynthesis and Metabolism. Edited by P. J. Davies. *Plant Hormones: and Their role in plant growth and development*. Kluwer Academic Publishers. pp. 164-170
- Skoog, F. and Miller, C. O. 1967. Auxin and Cytokinin. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-31
- Sorensen, D. F. 1969. Revisión of the genus *Dahlia* (Compositae, Heliantheae, (Coriopsidinae) *Rhodora* 71: 1-417
- Torres, K. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. Sigma Chemical Company. Missouri Publised by Van Nostrand Rainhold. New York. pp.54-55.
- Ueda, H., Torikata, H. 1972. Enviromental and ormanental plant: us relation. *Am. Orquid Soc. Bull.* 41:202-5.
- Van del Krol, A. R., Lenting, P. E., Veenstra, J., van der Meer, I. M., Koes, R. E., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M., and A. R. Stuitje. 1988. An anti-sense chalcona synthasa gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-869.

- Vasil, I. and Thorpe A. 1991. Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands. pp. 335 - 345.
- Verma, D. P. S. 1993. Control of plant gene expression. CRC., Press, Miami, USA. pp. 25-155.
- Wang, W. C., Tronchet M., Larroque N., Dorion N. and Albouy J. 1988. Production of virus-free dahlia by: Meristem-culture and virus detection through cDNA probes and ELISA. *Acta Horticulturae* 234: 421-428.
- Wang, K., Herrera-Estrella, A., Van Montago, M. 1995. Transformation of plant and Microorganisms. Cambridge University Press. pp. 137-145.
- Webb, C. L. 1994. Plant regeneration from mesophyll protoplast of *Lactuca pernis*. *Plant cell and Tissue and Organ Culture* 38: 77-79.
- Wei, S. L., Li, P. M., He, Z. P., and Han, B. M. 1990. Rapid propagation of monomerous stem by tissue culture culture *Dahlia pinnata* Cav. *Acta Agricultural Universitatis Pekinensis* 16(4); 381-385.