

## MICROPROPAGACION DE DALIA (*Dahlia variabilis* Cav.)

Hernández Pérez, F.<sup>1</sup>; Mejía Muñoz, J.M.<sup>2</sup>

**RESUMEN.** Se describe un método de propagación *in vitro* de dalia (*Dahlia variabilis* Cav.) a partir de yemas florales y ápices de tallo. Yemas florales cultivadas en un medio de Murashige y Skoog (IAA) con (0.1 mg/l<sup>-1</sup>), + BAP (0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/l<sup>-1</sup>). El enraizamiento de los brotes puede hacerse en un medio con AIA (0.5 mg/l<sup>-1</sup>), o incluso, sin auxinas en el medio de cultivo, pero fue evidente que existe variación en la capacidad de enraizamiento de los brotes. Los ápices cultivados en presencia de BAP, producen brotes pigmentados de color rojizo.

**PALABRAS CLAVE:** Yemas florales, pigmentación, variabilidad, cultivo de tejidos.

### DAHLIA (*Dahlia variabilis* Cav.) MICROPROPAGATION

**SUMMARY.** Dahlia plant propagation procedure through shoot tip or floral buds is described. Shoots can be obtained from floral buds in a Murashige and Skoog medium with IAA (0.1 mg/l<sup>-1</sup>) + BAP (0.25 mg/l<sup>-1</sup>). Shoot tips produce shoots in almost all combinations of IAA (0, 0.05, 0.1 mg/l<sup>-1</sup>) + BAP (0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/l<sup>-1</sup>). Roots are produced with IAA 0.5 mg/l<sup>-1</sup> or without auxins, although variability of rooting is evident. Shoot tips cultured with BAP tend to produce pigmented reddish color shoots.

**KEY WORDS:** Floral buds, pigmentation, variability, tissue culture.

### INTRODUCCION

La dalia es una planta de propagación asexual, que tiene un ciclo de crecimiento anual, pasa el período invernal en reposo por la presencia de temperatura y humedad impropias para su crecimiento. Cada año se encuentra expuesta al ataque de enfermedades de tipo sistémico, las cuales si no matan a la planta, se van acumulando con el tiempo.

Por otra parte, la capacidad de reproducción por semilla, la condición poliploide y poca domesticación, han permitido que se expresen fenotipos muy distantes a los esperados, por lo que al integrarlos a un programa de mejoramiento genético, permiten la selección directa de individuos sobresalientes, o su integración como progenitores de amplia aptitud combinatoria general.

El cultivo de tejidos en dalia, tiene como objetivo el propagar plantas de interés en cantidad y calidad sanitaria adecuadas para su aplicación comercial o a un programa de mejoramiento genético más eficiente.

### REVISION DE LITERATURA

El primer trabajo de cultivo de tejidos en dalia fue el de Morel y Martín (1952) quienes cultivaron meris-

temos apicales fuertemente atacados por el virus del mosaico de la dalia (DaMV) en una solución de Knop al 50%, con 2% de glucosa y 0.5 mg/l<sup>-1</sup>, logrando el desarrollo de los brotes pero sin formación de raíces.

Más tarde Read y Gavilertuatana (1976) intentaron regenerar planas a partir de segmentos de hojas o de flores liguladas cultivadas en un medio de Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de (BAP) bencilaminopurina y ácido naftalenacético (ANA); en ambos casos sólo se regeneró callo.

Los ápices de dalia (*D. pinnata*) cv. "Gillan" al sembrarse *in vitro*, en una solución de Knop con ácido indol-3-acético (AIA) más cinetina, a pesar de tener la misma constitución genética, responde de una manera muy distinta, ya que de 102 ápices, 19 se desarrollan hasta formar plantas normales y de éstas, sólo 13 sobreviven al trasplante (Mullin y Schlegel, 1978). Aun cuando se da por hecho la micropropagación de dalia comercial (Read y Fellman, 1985), es evidente que no se cuenta con un sistema de cultivo *in vitro* que garantice una respuesta uniforme y favorable para la obtención de plantas en un mismo genotipo.

No se ha estudiado los parámetros involucrados en cultivo de meristemos en dalia y la propagación rápida de plantas libres de virus (Wang et al., 1988),

<sup>1</sup> Ingeniero agrónomo, Esc. de fitotecnia, UPAEP, Puebla, Pue.

<sup>2</sup> Profesor investigador Depto. Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. C.P. 56230.

para una aplicación comercial del cultivo de tejidos. Recientemente se han mejorado tanto las técnicas de detección de virus en plantas enfermas, como la eliminación de éstos y la multiplicación a tasas de 7 a 10 plantas por meristemo, considerando factores como el cultivar, la intensidad de luz y la edad del esqueje (Wang *et al.*, 1988), aunque de todos modos sigue existiendo una amplia variación de respuestas de los ápices.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal.

El material vegetal se obtuvo de plantas de dalia previamente seleccionadas por sus características morfológicas y sembradas a fines de mayo de 1992.

Se utilizaron ápices vegetativos, yemas florales y botones florales a punto de mostrar las primeras flores liguladas.

### Desinfección del material vegetativo.

Los ápices y yemas florales se enjuagaron previamente en agua corriente, después se les eliminaron las hojas y brácteas externas respectivamente. Se sumergieron en alcohol 70% por un minuto, posteriormente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio comercial equivalente a 1.8% de ingrediente activo y Tween 20, durante 25 minutos. Inmediatamente después se decantó el hipoclorito y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, todo esto en condiciones de asepsia.

A los brotes florales se les eliminó todas las flores liguladas y tubulares, para dejar únicamente el receptáculo floral, el cual se sometió al mismo proceso de desinfección, variando únicamente el tiempo de exposición al hipoclorito, siendo en este caso de 40 minutos.

### Tratamientos.

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Shoog suplementados con  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de inositol,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa, ajustando el pH a  $5.6 \pm 0.1$  y solidificando con  $8 \text{ g l}^{-1}$  de agar.

Los ápices vegetativos se sembraron en 12 combinaciones de reguladores de crecimiento diferentes de AIA (0, 0.05,  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y BAP (0, 0.05,  $0.1, 0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ). Mientras que la yemas y los botones florales se sembraron en seis medios diferentes, que son la combinación de AIA (0 y  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y BAP ( $0.1$  y  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ).

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con 12 repeticiones, considerando como unidad experimental a cada tubo con un explante.

### Variables evaluadas.

Número y longitud de brotes, porcentaje de pigmentación, porcentaje de enraizamiento y presencia de callo.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

Los receptáculos de los botones florales presentaron un alto porcentaje de contaminación debido a la presencia de una bacteria sistémica. Los receptáculos que sobrevivieron, lograron desarrollar una callosidad en toda su superficie; esto ocurrió, incluso, en el medio sin reguladores de crecimiento, lo cual puede reflejar un nivel endógeno de auxinas superior al de citocininas en esta fase de desarrollo del botón floral.

Después de tres meses de cultivo no se observaron cambios en la morfología de los receptáculos. Read y Gavilertuatana (1976) obtuvieron resultados similares al cultivar *in vitro*, flores liguladas y tubulares de dalia.

### Yemas florales.

Yemas florales de un tamaño menor a 1 cm de diámetro, lograron continuar con su desarrollo permitiendo el crecimiento de flores su liguladas en algunos casos. El tratamiento de  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA más  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP permitió la diferenciación de un brote en 25% de las yemas florales (Fig. 1). Esto apoya la hipótesis de que es posible generar brotes a partir de ápices reproductivos, por lo que debe existir una reversión en las yemas florales hacia ápices vegetativos (Kim *et al.* 1981), probablemente debido a una acumulación de citocininas en los ápices vegetativos, los cuales se mantienen en las yemas florales más jóvenes (Kannangara y Booth, 1974).

CUADRO 1. Efecto de la interacción de las concentraciones de AIA con BAP sobre el incremento del brote de dalia.

AIA $\text{mg l}^{-1}$	BAP	Longitud del brote (mm)	% presencia de raíces por tratamiento	Longitud promedio de las raíces (mm)	Número raíces
0.1	0.00	18.42 a*	35.71	41.66	2.6
0.1	0.1	7.5 ab	0.00	0.00	0.0
0.05	0.1	5.42 ab	0.00	0.00	0.0
0.00	0.2	4.67 ab	0.00	0.00	0.0
0.05	0.05	4.17 ab	0.00	0.00	0.0
0.1	0.2	4.08 ab	0.00	0.00	0.0
0.1	0.05	3.58 ab	0.00	0.00	0.0
0.00	0.1	4.58 ab	0.00	0.00	0.0
0.05	0.2	2.92 ab	0.00	0.00	0.0
0.00	0.05	4.75 ab	0.00	0.00	0.0
0.05	0.00	2.42 b	16.67	19.00	2.0
0.00	0.00	2.92 b	7.69	8.00	1.0

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.





Figura 1.

### Apices vegetativos.

Existe una fuerte tendencia de los ápices vegetativos a continuar creciendo como un sólo tallo, ya que en todos los tratamientos probados, hubo desarrollo de un solo brote por cada ápice sembrado, lo cual sugiere una fuerte determinación del desarrollo vegetativo. Los ápices que presentaron el mayor crecimiento fueron los del tratamiento de  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA y sin BAP (Cuadro 1).

Al realizarse la comparación de las medias de Tukey, para la longitud de brotes, se encontró que casi todos los tratamientos son iguales. Asimismo se observó que en ausencia de BAP existe formación de raíces en un 35% de los casos a los dos meses de cultivo, y que el tamaño de la raíz es mayor con la concentración más alta empleada (Fig. 2).

En todos los trabajos hechos en cultivo de tejidos de dalia, se ha observado un desarrollo de un tallo por ápice, por lo que la tasa de multiplicación se reduce notoriamente dependiendo del número de nudos por brote obtenido *in vitro* (Mullin y Schlegel, 1978), pero aparentemente se ha logrado obtener una tasa de multiplicación de 7 a 10 brotes según el cultivar, en subcultivos posteriores (Wang *et al.*, 1985), empleando únicamente  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de ANA y 2 g/l carbón activado.

### Enraizamiento.

De los ápices cultivados durante dos meses, se seleccionaron aquellos que presentaron mayor tamaño, para pasarse a un medio con  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA. De 70 brotes, sólo 13 lograron enraizar, en el medio con AIA. Si consideramos lo observado en la fase de

multiplicación, donde hubo formación de raíces aún en el medio sin reguladores de crecimiento, se debiera concluir que no existen problemas de enraizamiento, sin embargo, se ha observado que existe una variación muy amplia al respecto, ya que desde Morel y Martin (1952), hasta Wang *et al.* (1988), en todos los casos se han observado problemas muy serios para obtener plantas con plétas, variando los porcentajes de enraizamiento de 0% hasta 95% dependiendo del genotipo. Por otra parte, está bien establecido que existen cultivares de dalia de fácil o difícil enraizamiento *in vivo* (Biran y Halevy, 1973).



Figura 2.

### Pigmentación.

Fue notoria la pigmentación rojiza de los brotes desarrollados en la mayoría de los tratamientos, sobre todo en el de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y sin AIA (Fig. 3). Esto probablemente se debe a que la BAP favorece la pigmentación de los tallos, participando en la activación de genes de antocianinas (Obrenovic, 1985).

La pigmentación de tallos y raíces tuberosas en dalia se ha asociado con temperaturas frías (Sierra *et al.*, 1992) y posiblemente exista una relación entre esta pigmentación favorecida por citocininas o frío, y el fenotipo de las flores.

### Descripción de las plantas obtenidas.

Las plantas obtenidas presentaron variaciones en el color de los tallos, predominando el rojo, con 1 a 4 pares de hojas, las cuales en algunos casos fueron





Figura 3.

unifoliadas, característica de la etapa juvenil, en otros casos fueron trifoliadas o pentafoliadas.

El sistema radical fue del tipo fibroso, presentando de dos a cinco raíces por planta, en algunos casos se observó engrosamientos semejantes a los de las raíces tuberosas.

#### CONCLUSIONES.

- Yemas florales de dalia son capaces de revertir su desarrollo reproductivo para radiferenciar brotes vegetativos.
- La mayor formación de brotes se obtiene en un medio de Murashige y Skoog con  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA.
- Existe una variación muy amplia en la capacidad de enraizamiento de los brotes.
- La presencia de BAP en el medio de cultivo favorece la pigmentación de los brotes obtenidos.

#### BIBLIOGRAFIA.

- BIRAN, I.; A.H. HALEVY. 1973. Endogenous levels of growth regulators and their relationship to the rooting of dahlia cuttings. *Physiol. Plant.* 28:436-442.
- KANNANGARA T.; A. BOOTH. 1974. Diffusible cytokinins in shoot apices of *Dahlia variabilis*. *J. Exp. Bot.* 25:459-467.
- KIM Y.J.; P.M. HASEGAWA; R.A. BRESSAN. 1981. *In vitro* propagation of Hyacinth. *HortScience.* 16:645-647.
- MENDOZA A., J.L.; J.M. MEJIA M. 1989. Desarrollo de raíces tuberosas en plantas de dalia. II. Congreso Nacional, AMEHOAC-UPAEP, Puebla, Méx.
- MOREL, G.; C. MARTIN. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris.* 235: 1324-1325.
- MURASHIGE T.; T. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- MULLIN, R.H.; D.E. SCHLEGEL. 1978. Meristem-tip culture of dahlia infected with dahlia mosaic virus. *Plant. Dis. Rep.* 62:565-567.
- OBRENOVIC, S. 1985. Effect of riboflavin and cyanide on blue light induction of betacyanin formation in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Physiol. Plant.* 65:418-422.
- READ, P.E.; C.D. FELLMAN. 1985. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. *Acta Hort.* 166:15-20.
- ; P. GAVILERTUATANA. 1976. Advances in tissue culture: ray flower and protoplast culture. *Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 26:275-286.
- SIERRA, R.E.; M.R. ARCOS J.; J.M. MEJIA. 1992. Selección de semillas de dalias resistentes a temperaturas bajas. I. Simposio Nacional Sobre Plantas Nativas de México con Potencial Ornamental, UPAEP-AMEHOAC, Puebla, Méx. Resúmenes de Ponencias.
- WANG W.C.; M. TRONCHET; N. LARROQUE; DORION N.; J. ALBOUY. 1988. Production of virus-free dahlia by meristem-culture and virus detection through DNA probes and Elisa. *Acta Hort.* 234:421-428.