



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**INDUCCIÓN MUTAGÉNICA EN CULTIVARES DE *Eustoma grandiflorum*
MEDIANTE EL USO DE METANOSULFONATO DE ETILO (EMS).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA.

PRESENTA:

BIOLOGO RAFAEL DE JESUS MENDOZA GÓMEZ

Guadalajara, Jalisco, octubre 2020.





CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



INDUCCIÓN MUTAGÉNICA EN CULTIVARES DE *Eustoma grandiflorum* MEDIANTE EL USO DE METANOSULFONATO DE ETILO (EMS).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA.

PRESENTA:

BIOLOGO RAFAEL DE JESUS MENDOZA GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RODRIGO BARBA GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. ERNESTO TAPIA CAMPOS

Guadalajara, Jalisco, octubre 2020.



Índice general

Agradecimientos	5
Resumen	8
Introducción.....	9
Marco teórico.....	11
Lisianthus.	13
Producción de lisianthus.....	16
Cultivo <i>in vitro</i> de lisianthus	17
Fitomejoramiento	18
Mutagénesis	20
Mutagénesis y cultivo <i>in-vitro</i>	28
EMS.....	31
Planteamiento del problema	38
Justificación	38
Hipótesis	39
Objetivos.....	39
Objetivo general	39
Objetivos específicos.....	39
Materiales y métodos.....	40
Resultados.....	44
Germinación de semillas.	44
Dosis letal media	47
Crecimiento vegetativo <i>in-vitro</i> :.....	49
Inducción de brotes.....	54
Adaptación y traspaso a invernadero.....	57

Invernadero.....	58
Variedad C43.....	58
Variedad C83.....	73
Errores mutagénicos.....	76
Conclusiones.....	80
Discusión.....	84
Anexo1.....	92

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo. Proyectos: CB-2012-183591 PlanTECC 314926. Así como a la Comercializadora Purépecha de Flores y Follajes.

Agradezco al doctor Rodrigo Barba González por su paciencia y comprensión, por su guía y su apoyo en momentos cruciales y difíciles. Al doctor Ernesto Tapia por su manera estricta y siempre objetiva, que pese a todo me concedió el beneficio de la duda y me impulsó a terminar este trabajo.

Agradezco con gran cariño a CIATEJ, lugar que me acepto desde la licenciatura y me acerco aún más al ámbito de la ciencia, siempre estricto y complejo pero lleno de buenos ratos, un ambiente excepcional y lugar donde conocí a muchos buenos compañeros y unos pocos amigos que me llevaré conmigo siempre. Sus laboratorios y aulas se volvieron mi segundo hogar.

A mis amigos Felipe y Andrés, par de camaradas que conocí en CIATEJ y con los cuales compartí los momentos más intensos y locos de estos años, así como los más tranquilos y dulces, todo sea por siempre ser mejor; mejor hombre, mejor persona, mejor amigo, mejor hijo, mejor hermano, mejor científico y un mejor biólogo.

A mi familia, clan de incansables luchadores, que hemos encontrado la fuerza en nuestros lazos y hecho de ellos trinchera y hogar. Por su apoyo incondicional, por las risas en los malos ratos y cada día de este camino que hemos andado. Porque son orgullo y empuje para aquellos dos que en su enfermedad han encontrado en su familia su mejor terapia, el cariño más incondicional, las lágrimas más sinceras. Porque cual sea el destino que nos prepare esta indescifrable vida los vea realizados y grandes, honorables a sí mismos y a los suyos. Porque en lo posible dejemos una huella positiva en este mundo. Porque en la soledad más austera hemos dado cuenta de que en realidad no estamos solos, somos familia.

A mi madre, guerrera incansable, la mejor descripción de un feminismo auténtico y solaz. Por sus fuertes raíces que son las mías. Mujer de mil batallas, de noches de hospital, en vela y angustia. Por su espíritu invencible, resiliente y decidido que ha dado todo de sí para su familia y todos aquellos que se acercan y tocan su corazón. Porque sus lágrimas y oraciones fueron bálsamo del alma en días que todo parecía imposible e injusto. Porque no he conocido carácter más inexorable y genuino, guía de sus pasos, y que a pesar de que como ser humano ha podido fallar, jamás ha sido motivo de bajar los brazos y claudicar. Por ella, madre y doctora, educadora y filósofa, cocinera y psicóloga, amiga, hija y hermana, juez y verdugo; por todo aquello que hace de manera simultánea, del alba al anochecer, espíritu incansable, a la que los años van alcanzando y que ha hecho todo por mantener una familia, un par de vidas y que juntos hemos aprendido que en presencia de la muerte se valora más la vida y nos hace querer no solo dejar una huella eterna en este mundo sino una más allá de ese velo que cubre la puerta entre la vida y la muerte, tan cercana y tan lejana.

FIGURA 1: PRODUCCIÓN NACIONAL POR ESTADO DE FLORES DE CORTE, 2004 (REVISTA CLARIDADES AGROPECUARIAS, P: 17, SISTEMA DE INFORMACIÓN AGRÍCOLA DE CONSULTA, GEM, SEDAGRO, 2004.)	12
FIGURA 2: VARIEDAD EUSTOMA GRANDIFLORUM GERMINADA Y CULTIVADA IN-VITRO; IZQ. VARIEDAD SILVESTRE. DER. VARIEDAD MEJORADA.	13
FIGURA 3: CULTIVO DE LISIANTHUS EN INVERNADEROS NEXTIPAC, JALISCO.	16
FIGURA 4: VARIEDAD DE LISIANTHUS "ROSE 1-3" GERMINADA IN-VITRO	17
FIGURA 5: ESQUEMA GENERAL DE PROCESOS BIOLÓGICOS EN LA INDUCCIÓN DE MUTAGÉNESIS CON SUS POSIBLES EFECTOS. (JIMÉNEZ, 2004)	30
FIGURA 6: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EMS. (SEGA, 1984)	31
FIGURA 7: ACCIÓN DEL EMS SOBRE EL OXÍGENO 6 DE LA GUANINA, FORMÁNDOSE O-6-ETIL-GUANINA, LA CUAL SE APAREA CON TIMINA. (GRIFFITHS.; ET AL,1996)	33
FIGURA 8: ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA SEGUIDA EN ESTE EXPERIMENTO.	43
FIGURA 9: GERMINACIÓN EN SEMILLAS DEL GENOTIPO C43 TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES A) CONTROL, B) .25M, C) .5M, D) .75M F) 1M DE EMS.	46
FIGURA 10: GENOTIPO C43, 15 DÍAS DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES EMS. A MAYOR CONCENTRACIÓN MAYOR LAS ABERRACIONES O QUIMERAS EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA.	50
FIGURA 11: GENOTIPO C74 EN CRECIMIENTO 15 DÍAS DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL EMS. NOTABLES ABERRACIONES QUIMÉRICAS EN CONCENTRACIONES .5M, .75M Y 1M.	51
FIGURA 12: GENOTIPO C83, 15 DÍAS EN CRECIMIENTO DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL EMS. VARIEDAD CON MAYOR SUSCEPTIBILIDAD AL EMS. NOTABLE LAS ABERRACIONES A PARTIR DE .5M DE EMS.	52
FIGURA 13: INDUCCIÓN DE BROTES.	54
FIGURA 14: RESCATE Y CRECIMIENTO DE BROTES OBTENIDOS POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA DESPUÉS DE SER TRATADOS CON EMS (C83).	55
FIGURA 15: DESPUÉS DE QUE LOS BROTES HAN CRECIDO Y FORTALECIDO LO SUFICIENTE (15-20DIAS), SE PASAN A CHAROLAS DE ACLIMATACIÓN DONDE CONSERVAR LA HUMEDAD Y LA TEMPERATURA SON ESENCIALES PARA EVITAR EL ESTRÉS Y LA MUERTE DE LA PLANTA (C83).	55
FIGURA 16: CONTROL, VARIEDAD C43	59
FIGURA 17: TRATAMIENTO .25M DE EMS, VARIEDAD C43	60
FIGURA 18: TRATAMIENTO .5M DE EMS, VARIEDAD C43	61
FIGURA 19: TRATAMIENTO .75M DE EMS, VARIEDAD C43	64
FIGURA 20: TRATAMIENTO 1M DE EMS, VARIEDAD C43	65
FIGURA 21: FLORES C83.	75
FIGURA 22: IMAGEN SUPERIOR: IZQ. (CONTROL C40) DER. (CONTROL C74). C40 .25M DE EMS (INFERIOR CENTRAL).	76
FIGURA 23: VARIEDAD C40, IMAGEN IZQUIERDA. (.5M EMS), IMAGEN DERECHA (.25M EMS).	77
FIGURA 24: ABERRACIÓN EN HOJAS, CRECEN DE MANERA DESORDENADA. VARIEDAD C40 (.5M DE EMS)	77
FIGURA 25: VARIEDAD C74; CONTROL, .25M, .5M DE EMS.	78
FIGURA 26: VARIEDAD C83: .5M, .75M Y 1M DE EMS.	79

TABLA 1: POSIBLES CONSECUENCIAS EVOLUTIVAS DE (ALGUNAS) MUTACIONES	19
TABLA 2: TIPOS DE MUTACIONES; LAS MUTACIONES SE PRODUCEN EN LOS INDIVIDUOS DE LAS POBLACIONES INDEPENDIENTEMENTE DE SI CONFIEREN O NO AL INDIVIDUO ALGUNA VENTAJA ADAPTATIVA (CARÁCTER PRE-ADAPTATIVO)	21
TABLA 3: MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA.	25
TABLA 4: MUTANTES ORNAMENTALES LIBERADAS. (MALUSZYNSKI ET AL., 1992)	27
TABLA 5: ALGUNAS ESPECIES EN HORTICULTURA TRABAJADAS CON EMS.	37
TABLA 6: TRATAMIENTOS Y TIEMPOS PARA CADA GENOTIPO UTILIZADO	42
TABLA 7: TOTAL DE SEMILLAS GERMINADAS; CONTROL: AGUA, EMS EN 4 CONCENTRACIONES.	44
TABLA 8: DOSIS LETAL MEDIA DE GERMINACIÓN DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL EMS.	48
TABLA 9: NÚMERO DE PLANTAS ADAPTADAS POR GENOTIPO Y POR CONCENTRACIÓN DE EMS USADO	56
TABLA 10: TIPO Y COLOR DE FLOR OBTENIDO POR TRATAMIENTO CON EMS. C40 Y C74 NO SE OBTUVIERON PLANTAS MADURAS. C43(P-PURPURA, L-LAVANDA, S-SIMPLE, C-COMPUESTA, *B-BLANCA)	58
TABLA 11: EL GENOTIPO C83 Y LAS POCAS MUTANTES OBTENIDAS; NÓTESE QUE LA MUTANTE .5M ES MORADA, ROMPIENDO EL ESQUEMA DE COLOR ROSA DE LA VARIEDAD.	73

Resumen

El mercado floral en México, en auge creciente y que de a poco gana importancia en la economía nacional, no solo necesita variedad sino calidad, cosa que el mercado floral ha dejado de lado en México para ser en su mayor parte de consumo nacional. Dentro de las nuevas posibilidades se encuentra la flor *lisianthus*, la cual es de interés en el mercado internacional debido a que es un especie poco cultivada y atractiva para los productores, además es originaria de zonas calurosas de América central y del norte. Posee una flor atractiva y de colores vistosos como morado y amarillo, producto de un amplio rango de flavonoides y antocianinas. Esta flor posee variedades comerciales catalogadas y patentadas, además es factible el mejoramiento genético pues se conocen algunas de sus rutas metabólicas y las concentraciones de fitohormonas para su cultivo *in vitro*. La mutagénesis como herramienta de mejoramiento genético es de los métodos más usados, tanto físicos (rayos gamma, rayos X, etc.) como químicos (Metanosulfonato de Etilo (EMS), óxido nitroso (NO₂)); por lo que en este trabajo se utilizó del EMS como inductor de la variabilidad genética en cuatro genotipos de *lisianthus* (C40, C43, C74, C83), con cuatro concentraciones; 0.25M, 0.5M, 0.75M y 1M, además del control (H₂O), durante 1 y 2 horas de exposición. Nuestros resultados demostraron que el tiempo máximo en el que se vuelve tóxico el EMS es 1h y el porcentaje más bajo de sobrevivencia es a 1M durante 1h de exposición. Además, el porcentaje de sobrevivencia *in vitro* disminuye de manera inversamente proporcional al aumento de la concentración de EMS. La concentración letal media es de 0.5M, comprobando una disminución en tamaño y un crecimiento errático y en genotipos como C40 un crecimiento desordenado. Ello nos demuestra el alto grado de toxicidad del EMS y su capacidad para inducir cambios, aunque inespecíficos y al azar.

Palabras clave: mutagénesis, flavonoides, fitohormonas, antocianinas, *lisianthus*, *in vitro*.

Introducción

La cultura de la flor es medular en un país megadiverso como el nuestro, colmado de tradiciones, rebosantes de colores y aromas. Cual sea en conmemoración todas ellas conllevan el uso de flores como decoración u obsequios. Incluso se han encontrado usos como extracción de compuestos aromáticos, colores, antioxidantes, etc. Mostrando el gran potencial del mercado floral a nivel nacional y la posibilidad de aportar calidad genética en el mercado internacional. Pues es una economía que crece y en países desarrollados su demanda de mercado es alta, favorecido además nuestro país con climas y tierras fértiles para producción de flores de calidad.

En México de la superficie territorial, el 11 % corresponde al uso agrícola del cual un 0.07 % (16,242 Has) está destinado para uso de plantas ornamentales, de las cuales se obtuvo un valor de la producción de 5,251.66 millones de pesos en 2008 (Granada y Acuña, 2010). En el país aproximadamente 25,500 productores de flores generan un valor de producción de 5,445 millones de pesos, quienes detonan –en el mercado ornamental- alrededor de 188 mil empleos permanentes, 50 mil eventuales y un millón indirectos. La cosecha de 2010 fue de 23 mil 183 hectáreas, con un valor de producción de cinco mil 445 millones de pesos generados por 25 mil 500 productores de flores de corte, plantas en maceta, follaje de corte y de maceta (SAGARPA 2012)

La micropropagación, el rescate de embriones, la mutagénesis asistida por medios químicos o irradiación y métodos *in vitro* de hibridación interespecífica han sido utilizados por los mejoradores en la industria de la floricultura. La combinación de cultivo *in vitro* y la mutagénesis es relativamente barata, sencilla y eficaz, ya que, permite el manejo de poblaciones grandes y un aumento de la eficiencia de inducción de mutación, recuperación de mutantes y rapidez en la clonación de los mismos. Un límite de la biotecnología de transferencia de genes, se encuentra en especies recalcitrantes, pero no para el mejoramiento por inducción de mutación. La mutagénesis ofrece la posibilidad de modificar sólo uno o unos pocos caracteres,

ya que, puede cambiar un rasgo dominante a uno recesivo en su mayoría, utilizado para los cultivares ya de primera categoría, conservando las características generales.

Estos rasgos incluyen el tamaño de la planta, la floración y el tiempo de maduración del fruto, el color del fruto, la auto-compatibilidad, auto-adelgazamiento y la resistencia a patógenos (Ahloowalia, 1998; Shibata, 2008).

La tecnología de marcadores moleculares ofrece herramientas para ayudar en la inducción de mutación, investigando tanto la variación genética dentro de las poblaciones y la detección precoz de mutantes con características deseadas. Sin embargo, el precio todavía representa una limitación importante para su aplicación (Jain & Häggman, 2007).

Marco teórico

México está considerado un país rico en recursos naturales gracias a la gran diversidad de climas, la riqueza de sus suelos, el nivel de precipitación pluvial, etc. En sus 5'120 679 kilómetros cuadrados de superficie territorial (INEGI, 2018), se pueden localizar todos los paisajes naturales existentes en el mundo, todo esto gracias a su posición geográfica, que está entre la zona tropical de América Central y la subtropical y templada de América del Norte.

En México se producen principalmente 50 especies diferentes de flores (rosas, gladiolas, claveles y crisantemos representan el 56% de la superficie cultivada y el 89% de la producción de flores) y esta producción se encuentra concentrada en la parte central del territorio mexicano, principalmente en el estado de México, siendo el municipio de Villa Guerrero el principal productor nacional, con aproximadamente el 50% de la producción nacional. En el cuadro 1 se muestra la producción nacional por estado hasta el 2004. (Floricultura mexicana; Flores de corte, 2006)

Hasta hoy México posee un mercado floral interno atractivo y con grandes oportunidades y Jalisco ofrece los climas idóneos por su situación geográfica, por ejemplo, Arboleda Peña (2016), señala que “...*aún falta que Jalisco amplíe su cultura agrícola con las flores, esto requiere más promoción e inversión, como ocurrió con las berries. La floricultura requerirá capacitación, tres o cuatro hectáreas, trabajar en un proyecto uno o dos años, iniciar en el mercado local, y producir con buena calidad y volumen*”. Por ello no solo la mejora de los cultivos sino la alternancia en las especies puede mejorar las condiciones de este mercado. Por ejemplo, el lisianthus, una especie poco conocida y de colores llamativos y poco usuales en otras especies, comienza a ser tomada en cuenta para su producción ya que es una flor parecida a la Rosa y en comparación está con mejores márgenes de ganancia para el productor.

México posee ya una alta producción de flores; la mayoría para consumo local, ya sea por fechas importantes de festividades o por ocasión, el mercado floral tiene hectáreas importantes de cultivo, la mayoría en el estado de México, pero en varios estados los cultivos de flores son de importancia como se muestra en la figura 1.

ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA PRODUCTORES DE FLOR (2004)			
ESTADO	Superficie sembrada (has)	Valor de la producción (pesos)	Principales cultivos
MÉXICO*	5,392.00	3,046,308,272.50	Crisantemo, Gladiola, Clavel, Rosa, Nube, Girasol, Astor, Ave de Paraiso, Nardo, Alhelí, Dálar, Lilium, Statice, Terciopelo, Gerbera, Zempoaxochtlí, Agapando, Solidago, Astroamaría, Inmortal, Noche Buena, Geranio, Begonia, Línea Ornamental, Patunia, Aljiste Ornamental, Cineraria, Rosa (planta), Calanchoe, Cyclamen, Polar
PUEBLA	3,628.00	297,832,822.72	Gladiola, Zempoaxochtlí, Nube, Plantas de Omato, Alhelí, Flores (gruesa), Statice, Crisantemo, Rosa, Rosa (gruesa), Noche Buena.
MORELOS	1,227.90	168,863,065.00	Gladiola, Rosa (gruesa), Nardo (gruesa), Noche buena, Crisantemo, Pasto (tapete), Polar, Zempoaxochtlí.
SAN LUIS POTOSÍ	809.5	9,344,050.00	Palma de Omato Camedaz Flores, Zempoaxochtlí
GUERRERO	513	83,271,875.00	Gladiola, Nardo, Zempoaxochtlí, Margarita, Pasto (tapete), Terciopelo, Nube, Rosa, Flor perita.
MICHOACÁN	476.4	72,565,251.40	Gladiola, Ave de Paraiso, Zempoaxochtlí, Nube, Rosa, Mano de Leon, Noche Buena, Inmortal, Gypsophila.
JALISCO	476	28,935,949.25	Pasto (tapete), Ave de paraiso.
BAJA CALIFORNIA	465.2	99,556,640.47	Flor Cama, Palma de Omato.
SINALOA	342	37,958,000.00	Zempoaxochtlí
VERACRUZ	276.75	11,417,590.00	Gladiola, Palma de Omato, Azucena, Nardo, Agapando.
OAXACA	200	6,549,650.00	Zempoaxochtlí, Gladiola.
DISTRITO FEDERAL	175.7	219,574,742.00	Noche Buena, Rosa, Geranio, Alhelí, Clavel.
QUERÉTARO	80	16,120,791.95	Rosa
DURANGO	42	2,000,000.00	Mano de Leon, Zempoaxochtlí, Margarita.
NAYARIT	23	3,350,000.00	Pasto (tapete)
HIDALGO	21.5	8,953,096.96	Zempoaxochtlí, Rosa.
SONORA	21	1,706,200.00	Margarita.
TLAJCALA	14	477,600.00	Zempoaxochtlí, Rosa.
YUCATÁN	8.46	48,651.00	Crisantemo, Margarita, Rosa.
GUANAJUATO	6	80,700.00	Zempoaxochtlí
CHIHUAHUA	3	440,000.00	Crisantemo
BAJA CALIFORNIA SUR	2	99,990.00	Plantas de Omato
COAHUILA	2	88,500.00	Flores varias

Figura 1: Producción nacional por estado de flores de corte, 2004 (Revista Claridades agropecuarias, p: 17, Sistema de información agrícola de consulta, GEM, SEDAGRO, 2004.)

Lisianthus.

Clasificación y descripción botánica

Reino: Vegetal

Subreino: Espermatofitas

División: Herbaceae

Clase: Angiospermas

Orden: Gentianales

Familia: Gentianaceae

Subfamilia: Gentianeae

Tribu: Centarium

Género: Eustoma

Especie: grandiflorum (Raf.)



Figura 2: Variedad *Eustoma Grandiflorum* germinada y cultivada in-vitro; izq. Variedad silvestre. Der. Variedad mejorada.

El género *Eustoma* pertenece a la familia Gentianaceae, se encuentra en las regiones calurosas del sur de los Estados Unidos, México, Antillas y norte de Sudamérica. (Harbough, 2006)

Su hábitat natural son las praderas de los estados llanos. Se ha observado en la parte norte de México, Texas, Oklahoma, Kansas, Nebraska, Colorado, Wyoming y Dakota del Sur (Shinnner, 1957) (Wood & Weaver, 1982). Sin embargo, fue reintroducida por una empresa particular como híbrido F1 a principios de la década de 1980 donde *lisianthus* tenía un aspecto nuevo y mejorado (Roh & Lawson, 1984). Su introducción en Europa y Japón se hizo en los años 30. A través de sucesivos programas de mejoramiento genético, realizados en su mayoría por empresas japonesas (Olvera, 2004). Actualmente esta planta se cultiva principalmente en Japón, Europa y Estados Unidos debido a la gran diversidad de flores y alta productividad que presenta (Barbaro *et al.*, 2009).

Son plantas herbáceas caducifolias que alcanzan los 40 – 70 cm de altura. Presenta un tallo de 3 a 6 mm de diámetro; ramificado de la mitad hacia arriba donde sustenta los pedicelos florales en la axila de las hojas superiores, hojas sésiles, opuestas, enteras, ovales a lanceoladas u oblongas, con tres nervaduras, una longitud de 2 a 6 cm, de color verde grisáceo similar al de las hojas del clavel; flores vistosas con largos peciolos, solitarias o en panículas, cáliz largo con lóbulos en la quilla de 15 a 20 mm de longitud, acuminado; corola penta o hexábrada campanulada, compuesta por 5 a 6 lóbulos azules de 2 a 3 cm de longitud, morados y ocasionalmente blancos o rosas (Harbough, 2006)

El *lisianthus* es una especie ornamental poco conocida en México, probablemente porque no se cultiva en grandes extensiones, ya que sólo se reportan en producción Arteaga, Coahuila; Zacatepec, Morelos; Villa Guerrero, Estado de México; Tecamachalco, Puebla y Guadalajara, Jalisco (Dominguez, 2008).

Entre las flores para corte, el *lisianthus* es una planta de gran valor ornamental que está siendo introducida en los mercados internacionales con gran aceptación comercial gracias a sus sucesivos programas de mejora para la obtención de híbridos (Mazuela & Urrestarazu, 2007)

El interés actual de la producción de esta especie es debido principalmente a la gran diversidad de colores de las flores y la alta productividad (Fox, 1998). Es una especie que se prevé aumente

su demanda, ya que es muy atractiva para el consumidor, con gran variedad de colores y buena duración en maceta (Melgares, 1996)

Esta planta ornamental está siendo cultivada como flor de corte y de maceta. Su producción y popularidad está creciendo al ser considerada como una de las diez más vendidas en el sistema holandés. Puede presentar tres colores básicos: azul, rosa y blanco. (Fox, 1998)

Existen diferencias en preferencia en los tres mercados consumidores: el europeo prefiere el azul oscuro, en cuanto al japonés y brasileño prefieren el blanco con bordes azules (Camargo et al., 2004). El lisianthus también se divide en flores simples y dobles, siendo el mercado europeo y japonés los que prefieren las primeras, y el americano y brasileño las flores dobles (Corr & Katz, 1997)

Lisianthus se considera una flor que tiene un alto interés en el mercado internacional y dado que es una especie poco cultivada puede ser atractiva para los productores (Morales, 2013), por lo que en este estudio se revisarán las posibilidades de mejora de esta flor.

Producción de lisianthus

El costo de la plántula de lisianthus es relativamente alto, debido a que presenta una germinación poco uniforme, lo que dificulta la plantación automática en la cama de germinación.

La producción convencional de plántulas de lisianthus mediante semilla se realiza en bandejas multiceldas o "plug", con control de temperatura y humedad, tanto del ambiente como del sustrato, evitando condiciones extremas que favorecen el arrosetamiento. Las plántulas están listas para su trasplante entre los 60 y 70 días según las condiciones ambientales durante su desarrollo, aunque en la práctica se suele demorar hasta los 90 días, lo que produce grandes pérdidas. Las plántulas son trasplantadas cuando desarrollan 2 o 3 pares de hojas verdaderas expandidas. (Barbaro, Karlanian, & Morisigue., 2009)

Las plántulas deben de estar vigiladas hasta completar 4 hojas verdaderas, así como cuidar que la raíz llene la cavidad y tenga desarrollo hacia abajo evitando que se pase de tiempo ya que la raíz empieza a torcerse y acarrea pérdida de calidad y dificultades al trasplante.



Figura 3: Cultivo de Lisianthus en invernaderos Nextipac, Jalisco.

Cultivo *in vitro* de lisianthus

La multiplicación asexual de clones selectos a través del cultivo *in vitro* puede ser valioso en lisianthus, es decir, la manipulación individual de plantas seleccionadas que posean características deseables como lo son alteraciones en el tamaño de la planta, desarrollo, color y forma de las flores, así como resistencia a enfermedades principalmente. (Perez & Ivan, 2013)

Murashige (1962), menciona que hay cuatro áreas en las cuales la aplicación del cultivo de tejidos es de relevancia:

1. Producción de fármacos y otros productos naturales.
2. Mejoramiento genético de los cultivos.
3. La obtención de clones libres de enfermedades y la preservación de germoplasma importante.
4. La rápida multiplicación clonal de cultivos selectos.

Hay varias aplicaciones prácticas del cultivo de tejidos y células vegetales en la agricultura, las cuales incluyen, la inducción de plantas haploides a partir del cultivo de anteras y polen, el cultivo de protoplastos, la inducción y selección de mutantes y la propagación clonal o rápida multiplicación de genotipos específicos. (Perez & Ivan, 2013)



Figura 4: Variedad de lisianthus "Rose 1-3" germinada *in-vitro*

Fitomejoramiento

El fitomejoramiento comenzó a principios del año 10.000 AC durante la revolución neolítica, cuando las tribus de cazadores-recolectores comenzaron su cambio hacia una sociedad sedentaria y agraria. La domesticación de las plantas de cultivo parece haber tenido lugar simultáneamente en varias regiones subtropicales, en África central, el oeste de América del Sur, el sudeste de Asia y el Mediterráneo durante este período. (Sikora *et al.*, 2011)

Todavía es un tema de discusión si los primeros intentos de domesticación fueron guiados conscientemente o al azar, aunque las pinturas rupestres en la cueva de Lascaux en Francia y Altamira en España, así como en otros lugares, muestran que el hombre primitivo era consciente del ciclo de vida y la naturaleza que lo rodea. Los primeros experimentos con fitomejoramiento probablemente se limitaron a seleccionar los especímenes más viables de cada cosecha para la siembra posterior, que sin embargo tuvo un profundo impacto en el rendimiento del cultivo. Esta selección también alteró las plantas en formas nuevas, ya que la selección humana era en la práctica a menudo opuesta a la selección natural. (Sikora *et al.*, 2011)

Se infirió desde el principio que las plantas domesticadas no debían considerarse "naturales" y Charles Darwin acuñó el término "selección artificial" en 1859 para enfatizar la diferencia entre la selección en la naturaleza y la selección artificial. Luego elaboró más sobre el tema en un libro separado publicado en 1868.

La selección sistemática a lo largo de los años ha cambiado las plantas domesticadas al punto en que los parientes silvestres de las plantas de cultivo a menudo se clasifican en taxones completamente diferentes. (Sikora *et al.*, 2011)

Los mayores rendimientos de los cultivos domesticados permitieron una mayor densidad de la población humana, la formación de comunidades y la especialización laboral en áreas distintas a la producción de alimentos dentro de esas comunidades. El paso del forraje a la agricultura también trajo muchas consecuencias negativas para la humanidad, incluidas las nuevas enfermedades infecciosas y las epidemias causadas por el aumento de la densidad de la población y el comercio, junto con una disminución en la diversidad alimentaria. Aun así, es

seguro decir que el fitomejoramiento es la base misma de nuestra civilización moderna. (Sikora *et al.*, 2011).

Las mutaciones se generan de manera espontánea en la naturaleza, pero en una frecuencia reducida (alrededor de 10^{-5} y 10^{-8}). Para poder incrementar la tasa de ocurrencia (10^{-6} y 10^{-4}) se pueden utilizar diversos agentes mutagénicos químicos y/o físicos. (Danini & Sonnino, 1998; Predieri & Zimmerman, 2001)

Toda mutación trae consigo un cambio que no siempre puede ser favorable. Muchas de ellas (tabla 1), pueden ser por errores dentro del ciclo celular, pequeñas fallas en el sistema genético que trae consigo cambios en el genoma, ya sea a nivel puntual de una base o de un cromosoma completo. En la evolución, como todo en la selección natural, su implicación está muy ligada a la presión del ambiente, pues sino la mutación podría ser desfavorable, con implicaciones de fallas en el sistema biológico de la célula. Por ello mucho de la selección natural es azar con necesidad de adaptación al ambiente, ya sea por factores bióticos o abióticos. Así dentro de estos procesos una parte de los organismos perecerá mientras los que logren los correctos cambios prevalecerán.

Tabla 1: Posibles consecuencias evolutivas de (algunas) mutaciones

Nombre	Efecto	Causa
Mutaciones puntuales	Generación de alelos	Errores al duplicar o reparar el material genético
Duplicaciones	Posible aparición de nuevos genes	Entrecruzamiento desigual en la meiosis o retro transcripción
Cambios en la dotación cromosómica	Posible Especiación	Errores en la migración durante la meiosis

Mutagénesis

El papel del fitomejoramiento (mejoramiento de especies vegetales), cuyo objetivo principal es obtener plantas con cualidades agronómicas relevantes, ha sido con el paso de los años más sofisticado. Durante los pasados 50 años, la variabilidad genética, junto al mejoramiento del manejo en campo y los aciertos agronómicos han aumentado la cantidad y calidad en los cultivos. Con el incremento de las poblaciones y la reducción sustancial de las tierras de cultivo, se ha vuelto de suma importancia el fitomejoramiento para la obtención de nuevas variedades que puedan sustentar la producción bajo variadas condiciones agro-climáticas y diferentes regiones, siendo además los factores bióticos y abióticos hoy día tan inusuales y cambiantes. (Ahlowalia & Maluszynski, 2001)

En la naturaleza, la variabilidad ocurre por adquisición de nuevas características, ya sea a través de modificaciones en la información genética a nivel individual (mutaciones), o bien, por intercambio entre individuos distintos (recombinación genética). Estas modificaciones pueden prevalecer o perderse, según la presión de selección que ejerza el ambiente. En conjunto, estos mecanismos ayudan a las especies a desarrollar habilidades o defensas para enfrentar condiciones nuevas. (Santana, 1996)

Existen una clasificación para cada tipo de mutación (tabla 2), ya sea a nivel ADN o cromosómicos, lo que confiere aleatoriamente una modificación a nivel genético, y suceden independientemente de si confieren o no características favorables.

Muchas de las especies vegetales, sobre todo las plantas superiores, aceptan con facilidad un aumento del número cromosómico. De manera natural ya sea por duplicaciones o fallas en ciclo celular. Por ello, y en base al conocimiento que hemos adquirido sobre los sistemas genéticos hemos aprendido métodos de aumentar el número cromosómico, ya sea para adquirir características vegetativas favorables o mejorar y aumentar el tamaño del fruto.

Tabla 2: Tipos de mutaciones; las mutaciones se producen en los individuos de las poblaciones independientemente de si confieren o no al individuo alguna ventaja adaptativa (carácter pre-adaptativo)

Génicas	Cromosómicas
<p>▶ a) En el ADN</p> <p>1. Mutaciones puntuales</p> <p>2. Mutaciones por sustituciones de pares de bases</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transiciones <p>Purina – Purina</p> <p>Pirimidina - Pirimidina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transversiones <p>Purina - Pirimidina</p> <p>Pirimidina – Purina</p>	<p>a) Estructurales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Deleción - duplicación - translocación - inversión
<p>▶ b) En la Proteína</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mutación silenciosa - Mutación neutra - Mutación con cambio de sentido - Mutación sin sentido - Mutación por desplazamiento de la pauta de lectura 	<p>b) Numéricas</p> <ul style="list-style-type: none"> - aneuploidías - poliploidías

Los métodos de fitomejoramiento se han vuelto cada día más sofisticados desde los días de la simple selección entre las poblaciones naturales o cultivos tradicionales, la cual consistía en una mezcla de genotipos. Las poblaciones surgieron de variación natural y reproducción sexual. Hoy día, el fitomejoramiento se basa en crear variación, selección, evaluación y multiplicación de los genotipos deseados. Para incrementar la eficiencia y hacer más corto cada paso, los mejoradores hacen uso combinado de varias técnicas. Dentro de lo que pueden hacer, los mejoradores tienen la opción de usar, cultivo *in-vitro* para una rápida multiplicación, métodos

moleculares para la selección de genotipos, mutagénesis para aumentar la variación, control de las condiciones ambientales de cultivo para manipular el crecimiento y la floración, y una colaboración internacional para el intercambio de germoplasma. (Ahlowalia & Maluszynski, 2001).

La estrategia principal en el fitomejoramiento basado en mutaciones ha sido mejorar las variedades bien adaptadas alterando uno o dos rasgos principales. Estos incluyen caracteres como altura de la planta, madurez, rotura de semillas y resistencia a enfermedades, que contribuyen a un mayor rendimiento y rasgos de calidad. Ejemplificando, perfil y contenido de aceite, calidad del malteado y tamaño y calidad de los gránulos de almidón son algunas características que, en los genotipos de poca altura en el arroz, el trigo, la cebada y el maíz han contribuido significativamente a incrementar el rendimiento de grano debido a su resistencia al acame (doblez o inclinación que sufre el tallo) y la alta densidad de siembra. (Ahlowalia & Maluszynski, 2001)

Durante la evolución de los cultivos ha habido una reducción continua en diversidad genética, ya que los mejoradores genéticos se han enfocado cada vez más en los llamados cultivares "élite". Esta erosión genética eventualmente se convirtió en un cuello de botella y varias técnicas para inducir mutaciones y aumentar artificialmente la variación surgieron a mediados del siglo pasado. Inicialmente, la radiación de rayos X fue utilizado como un mutágeno ya que estaba disponible para investigadores. (Sikora *et al.*, 2011).

A lo largo de los años, la mutagénesis ha generado una gran cantidad de variabilidad genética y ha jugado un papel importante en los programas de mejoramiento de plantas en todo el mundo. Los registros mantenidos por la División conjunta FAO / OIEA en Viena muestran que 2965 cultivares, con uno o más rasgos útiles obtenidos de mutaciones inducidas, fueron liberados en todo el mundo durante los últimos 40 años (FAO-IAEA, 2011). Ejemplos notables son varias variedades de trigo (por ejemplo, trigo duro utilizado en la pasta), cebada, incluida la cebada

para malta, el arroz, el algodón, el girasol y la toronja, lo que ha tenido un enorme impacto económico positivo. (Sikora *et al.*, 2011)

La mutagénesis es un método altamente utilizado en biología vegetal para inducir variabilidad genética a una gran cantidad de cultivos, principalmente debido al hecho de que la tecnología es simple, relativamente barato de realizar, aplicable a todas las especies de plantas e igualmente utilizable a pequeña y gran escala (Swaminatan, 1995, Siddiqui & Khan, 1999).

En 1927, Muller demostró que el tratamiento de rayos X podría aumentar la tasa de mutación en una población de *Drosophila* en un 15,000%, y un año después, Stadler observó una fuerte variación fenotípica en plántulas de cebada y esterilidad en maíz después de la exposición a rayos X. Luego, técnicas más sofisticadas como la radiación gamma se desarrollaron en la nueva generación nuclear en diferentes centros de investigación, durante y después de la segunda guerra mundial. Las técnicas basadas en la radiación se complementaron por mutágenos químicos que eran menos destructivos, disponibles y más fácil de trabajar. (Sikora *et al.*, 2011)

Un trabajo pionero en esta área fue realizado por Auerbach y colaboradores, que demostraron una mayor frecuencia de mutación en *Drosophila*. Unos años más tarde, este trabajo fue seguido por el descubrimiento de metanosulfonatos y otros mutágenos químicos, que todavía están en uso hoy (Sikora *et al.*, 2011)

La frecuencia y la saturación de las mutaciones pueden ser reguladas variando la dosis de mutágeno y dependiendo de los agentes mutagénicos pueden inducir diferentes extensiones de lesiones genómicas, que van desde mutaciones en bases a inserciones o deleciones de fragmentos. En las plantas, la respuesta a mutágenos físicos y químicos es específico de cada especie y en gran parte aun es desconocido para la mayoría de las especies. (Siddiqui & Khan, 1999)

El objetivo en la reproducción de mutagénesis es causar máxima variación genómica con una disminución mínima en la viabilidad. Los mutágenos químicos han ganado popularidad ya que son fáciles de usar, no requieren ningún equipo especializado, y puede proporcionar una frecuencia de mutación muy alta. Comparado con los métodos radiológicos, los mutágenos químicos tienden a causar cambios en un solo par de bases (pb) o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) como se les conoce más comúnmente, en lugar de eliminaciones y translocaciones. (Sikora *et al.*, 2011).

En resumen, los mutantes inducidos por la radiación gamma son a menudo generados por la eliminación de grandes fragmentos de ADN, hasta 6 Mb (Naito et al., 2005), mientras que EMS induce la formación de aductos O-alkyl de los nucleótidos que conducen a la asociación errónea que preferencialmente causa transiciones C / G a T / A.

En suma, los mecanismos de mutagénesis son como muchos de los métodos usados por el hombre, una imitación de lo que la naturaleza hace ya de forma cotidiana. Mediante el método científico y nuestra capacidad inherente de observación podemos imitar un sinnúmero de procesos mediante los cuales podemos modificar y orientar los mecanismos biológicos a nuestra conveniencia para la mejora y obtener así las características deseadas de los organismos que son de utilidad para nuestra actualidad. Así pues, la mutagénesis es en cierto modo una imitación de los mecanismos de selección natural que la naturaleza lleva miles de años haciendo (tabla 3), y con la compilación de técnicas como el cultivo *in-vitro* y la presión selectiva favorecer las características agronómicas que nos interesan mejorar.

Tabla 3: Mecanismos de inducción de variabilidad genética.

Mecanismo Natural	Imitación
a) Mutación espontanea. b) Recombinación Genética.	a) Mutagénesis artificial mediante radiación o agentes químicos. b) Cruzas entre organismos de la misma especie o de diferente variedad y especie.
Selección natural al azar	Selección artificial de uno o varios organismos, de acuerdo a las características que se desea conservar.

De acuerdo con esta base de datos FAO / OIEA, de las 465 plantas mutantes liberadas por propagación vegetativa, la mayoría se encuentran entre floricultura y algunos árboles frutales; entre los que se encuentran el crisantemo, *Alstroemeria*, dalia, buganvillas, rosas, *Achimenes*, begonia, clavel, *Streptocarpus*, y azalea. (Perez & Ivan, 2013)

Durante la última década, el uso de productos químicos para la inducción de mutagénesis ha tenido un renacimiento con el desarrollo de la tecnología TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). En TILLING, la mutagénesis se complementa con el aislamiento del ADN cromosómico de cada línea mutada y el cribado de la población a nivel de ADN utilizando técnicas moleculares avanzadas.

En la mutagénesis convencional, las semillas son expuestas a un fuerte compuesto mutagénico, que introduce mutaciones aleatorias en todo el genoma; sin embargo, se tiene especial cuidado para lograr la saturación de mutaciones en el genoma objetivo. Antes de crear la población de TILLING, la mayoría de los investigadores comienzan por establecer una "curva de muerte" utilizando el mutágeno de su elección donde la concentración se representa frente a la supervivencia de la semilla. Una regla general es apuntar a una tasa de supervivencia del 30 al 80%. Después de la mutagénesis, las semillas (M1) se plantan y se dejan auto fertilizar y producir una nueva generación de semillas (M2). Normalmente, se siembra una semilla de cada línea para producir la población M2 y se aísla el ADN de cada planta M2. (Sikora *et al.*, 2011)

Una vez identificado en una población mutagenizada y probado para la estabilidad genética en el campo, el carácter se puede introducir en líneas de reproducción que carecen de ese carácter. Idealmente, la introgresión debe realizarse con la ayuda de un marcador, ya que reduce el número de cruces necesarios y también asegura que se eliminen tantas mutaciones aleatorias como sea posible de las líneas mutagenizada. Dicho marcador podría ser visible, bioquímico o molecular. Es preferible un marcador molecular, es decir, una mutación u otro reordenamiento del ADN que cosegrega con un carácter de calidad útil y tiene varias ventajas en comparación con la selección fenotípica convencional. Esto se conoce como "selección asistida por marcadores moleculares" (MMAS). (Sikora *et al.*, 2011)

Muchas especies de plantas de interés, han sido trabajadas en un inicio con la mutagénesis como método de mejoramiento genético. Desde los años 50s, con la aparición en época de guerra, de las técnicas radioactivas, se desarrollaron un sinnúmero de métodos, comenzado a ser cada vez más sofisticados; desde aquellos días donde de manera rudimentaria se empezaba a conocer el daño que podían tener a nivel genético todo organismo expuesto a la alta radiación. Con todo fue el método más efectivo hasta antes de la aparición de los agentes químicos, y aunque los métodos químicos tengan ventajas como su facilidad de uso y bajo costo, los métodos radioactivos siguen siendo altamente efectivos pues su daño a nivel ADN es tal que los cambios son, no solo inevitables sino en una probabilidad de 1:2 altamente efectivos o dañinos. Muchas de las especies que hoy día se comercializan (tabla 4), a mitad del siglo pasado fueron trabajadas en múltiples formas para obtener las características más llamativas y en cuanto a las especies ornamentales fueron liberadas al mercado con la certeza de que dichas características eran ya introgresivos dentro del genoma y con capacidad de ser heredadas.

Tabla 4: Mutantes ornamentales liberadas. (Maluszynski et al., 1992)

planta	No. de variedades
Chrysanthemum	187
Alstroemeria	35
Dahlia	34
Streptocarpus	30
Rose	27
Begonia	25
clavel	18
Azalea	15
Buganvilia	9
Achimenes	8
otras	77
total	465

Mutagénesis y cultivo *in-vitro*

Durante la última década, se han desarrollado y perfeccionado muchas técnicas *in-vitro* de cultivo de tejidos y células vegetales como ayuda para el fitomejoramiento convencional. El uso de técnicas *in-vitro* puede complementar el mejoramiento convencional de las plantas en varias etapas del fitomejoramiento. El fitomejorador dispone de varias técnicas *in vitro* que aumentan la eficiencia en la obtención de variación, selección y multiplicación de los genotipos deseados. Estas técnicas son particularmente valiosas en la mejora de plantas que se propagan a partir de partes vegetativas. (Van Harten, 1998; Ahlowalia & Maluszynski, 2001)

El cultivo *in vitro* y las tecnologías de ADN recombinante han abierto nuevas perspectivas para complementar la mejora de las plantas. Estas técnicas son particularmente adecuadas para mejorar las plantas de propagación vegetativa y para mejorar algunos rasgos en una variedad bien adaptada. En muchos casos, las técnicas de cultivo *in vitro* y de inducción de mutaciones se pueden combinar para obtener los genotipos deseados. (Ahlowalia, 1998)

La mayoría de las plantas de propagación sexual se pueden mejorar mediante la hibridación y la selección convencionales. Sin embargo, en muchas plantas de propagación vegetativa, p. Ej., Banano, plátano, mandioca, papa, batata, ñame y varias ornamentales, los recombinantes sexuales no se pueden obtener de la misma manera que en los cultivos propagados por semillas. Estos cultivos se propagan convencionalmente a partir de bulbos, tubérculos y esquejes. Muchas de estas plantas no producen semillas o su progenie de semillas es muy heterogénea. En algunos de ellos, la fertilización no da como resultado la producción de semillas. En otros, donde la hibridación interespecífica da como resultado solo unas pocas semillas o resulta en endospermo abortado. (Ahlowalia & Maluszynski, 2001)

Antes del desarrollo de las técnicas *in-vitro*, las mutaciones inducidas por radiación daban como resultado una serie de nuevas variedades en muchas plantas ornamentales, como Achimenes, crisantemo, clavel, rosas y streptocarpus (Broertjes, 1977). Muchos de estos mutantes se obtuvieron irradiando esquejes enraizados, hojas desprendidas y plantas inactivas. Inmediatamente se reconoció la alteración del color y la forma del tallo, el hábito de crecimiento (enano o rastro) y cualquier otro fenotipo nuevo de valor comercial.

Incluso las quimeras (por ejemplo, plantas de follaje abigarrado y buganvillas de brácteas blancas y rojas), que normalmente serían de valor limitado en plantas de cultivo como la papa y el banano, se hicieron populares entre los productores. (Ahloowalia, 1998)

En crisantemo ejemplificando, incluso entre una pequeña población de 105 plantas cultivadas *in vitro*, que se obtuvieron irradiando solo dos plántulas cultivadas *in vitro*, se obtuvieron 20 mutantes con cambio de forma, color o tamaño de flor. De estos, 15 mutantes fueron sólidos, uniformes y estables en las tres propagaciones posteriores (Ahloowalia, 1992). Asimismo, la irradiación *in vitro* de estreptocarpo produjo mutantes con cambio de color de flor y de clavel con cambio de forma de flor, color y tamaño de hoja (Ahlowalia & Maluszynski, 2001). También se han informado mutantes de cambio de color de flores en *Dianthus caryophyllus* cv. 'Mystere' tras la irradiación de esquejes nodulares *in vitro* con rayos X. (Cassells *et al.*, 1993).

La variación somaclonal puede proporcionar una variación adicional a la inducida mediante mutagénesis. La variación generada por el cultivo de tejidos, como la variación somaclonal y protoclonal, puede ser útil para mejorar las plantas hortícolas. Ya en 1975, se había informado de variación somaclonal entre las plantas regeneradas de raigrás que incluían albinos y aquellas con forma de hoja y vigor de la planta alterados. Los estudios meióticos mostraron que esta variación estaba asociada con la variación cromosómica que implicaba cambios numéricos en todo el genoma, por ejemplo, poliploidía y aneuploidía, y alteraciones estructurales como deleciones, translocaciones e inversiones. Estos cambios se observan generalmente entre plantas que han sido tratadas con altas dosis de rayos X. (Ahloowalia, 1976; 1983).

El cultivo *in-vitro* inherente a las técnicas de mutagénesis, son hoy en día métodos altamente eficientes para el mejoramiento genético. Esto, además, ha mejorado con técnicas moleculares, que hacen posible la visualización de las posibles mutaciones y con ello y el mapeo del genoma reconocer si hubo la mutación deseada en los genes diana. Esto sin dejar de lado que en este proceso la cantidad de organismos obtenidos es proporcional a los que no sobrevivieron a la mutagénesis. Estos procesos deben pasar por el ciclo de replicación puesto que el daño al ADN debe ser reparado y replicado; que los cambios no tengan una repercusión negativa y después de varios ciclos y que puedan ser introgresivos en el sistema genético de la célula. (figura 5)



Figura 5: Esquema general de procesos biológicos en la inducción de mutagénesis con sus posibles efectos. (Jiménez, 2004)

EMS

Se conocen varios productos químicos que son mutagénicos, clasificándose según su modo de acción en:

- (I) Análogos de bases
- (II) Agentes que reaccionan con el DNA
- (III) Agentes intercalantes
- (IV) Agentes alquilantes

El metanosulfonato de etilo (EMS) es un agente etilante monofuncional que se ha encontrado mutagénico en una amplia variedad de sistemas de pruebas genéticas, desde virus hasta mamíferos. También se ha demostrado que es cancerígeno en mamíferos (figura 6). La alquilación de sitios nucleofílicos celulares por EMS se produce a través de un mecanismo de reacción mixto $SN \sim / SN$.

Si bien la etilación del ADN ocurre principalmente en las posiciones de nitrógeno en las bases, debido al carácter $SN 1$ parcial de la reacción, EMS también puede producir niveles significativos de alquilación en oxígenos como el O 6 de la guanina y en los grupos fosfato del ADN. Los datos genéticos obtenidos utilizando microorganismos sugieren que EMS puede producir mutaciones de transición de GC a AT y AT a GC. También hay alguna evidencia de que EMS puede causar inserciones o deleciones de pares de bases, así como una mayor extensión intragénica. (Sega, 1984)

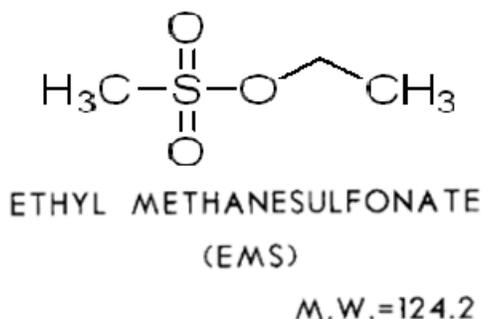


Figura 6: Estructura química del EMS. (Sega, 1984)

De los mutágenos químicos, el EMS (metanosulfonato de etilo) es hoy el más ampliamente utilizado. La mayoría de los cambios (70-99%) en EMS son mutaciones en las poblaciones de transiciones de par base GC a AT. Las mutaciones en las regiones de codificación pueden ser silenciosas, sin sentido. En regiones no codificadoras, las mutaciones pueden cambiar secuencias promotoras u otras regiones reguladoras, resultando en la regulación hacia arriba o hacia abajo de la transcripción de genes. Empalmes aberrantes de ARNm, alteración de la estabilidad del ARNm y cambios en la traducción de proteínas también pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis. (Sikora, 2011)

En muchos países, la inducción de la mutación mediante rayos X o rayos γ es común debido a su fácil aplicación y alta eficiencia. Los mutágenos químicos como el EMS también podrían ser utilizados y aplicados con éxito donde no hay instalaciones de irradiación disponibles. Sin embargo, no son ampliamente utilizados debido a su baja penetración en tejidos vegetales, como brotes, raíces y tallos, que causa una baja eficiencia y dificultades en la reproducción el experimento (Van Harten, 1998).

En organismos superiores, existe una clara evidencia de que EMS es capaz de romper los cromosomas, aunque los mecanismos implicados no se comprenden bien. Una hipótesis que se cita con frecuencia es que las bases de ADN etiladas por EMS (principalmente la posición N-7 de la guanina) se hidrolizan gradualmente a partir de la desoxirribosa en la columna vertebral del ADN dejando un sitioapurínico (o posiblemente apirimidínico) que es inestable y puede conducir a rotura de la hebra del ADN (figura 7). También existen datos que sugieren que la etilación de algunas proteínas cromosómicas en espermátidas de ratón por EMS puede ser un factor importante en la rotura de cromosomas. (Sega, 1984)

EMS es un mutágeno químico del grupo alquilante y ha sido ampliamente utilizado en las plantas porque causa alta frecuencia de mutaciones genéticas y baja frecuencia de aberraciones cromosómicas (Van Harten, 1998). Este mutágeno se ha utilizado para tratar semillas y tratar explantes *in vitro* de muchas especies.

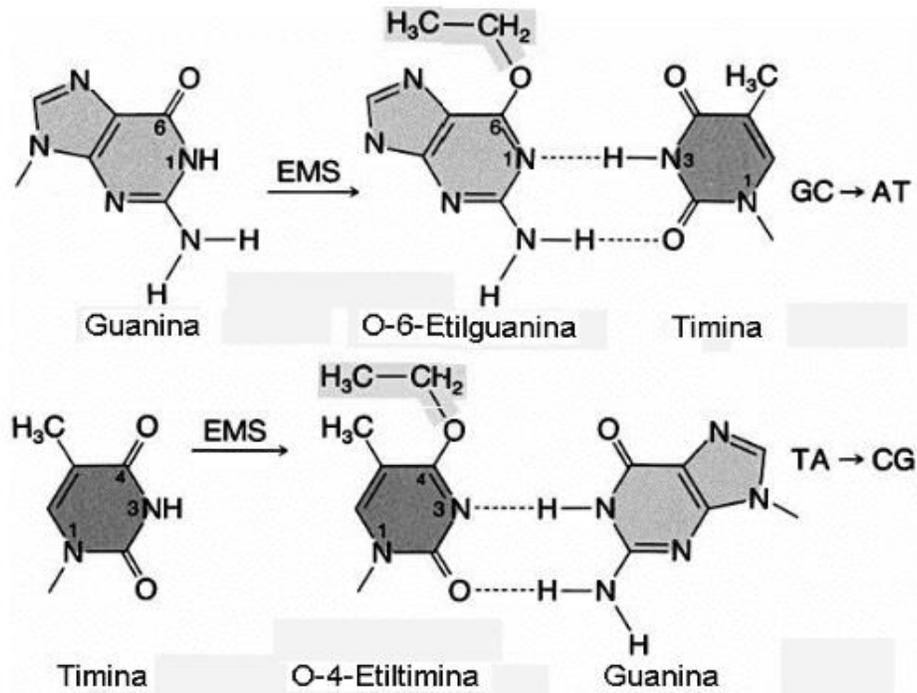


Figura 7: Acción del EMS sobre el oxígeno 6 de la guanina, formándose O-6-etil-guanina, la cual se aparea con timina. (Griffiths.; et al,1996)

Aunque hay estudios sobre el uso de EMS en plantas de crisantemo, no hay informes de uso de EMS en pedicelos florales de esta planta ornamental, a pesar del fácil manejo de ese tipo de explantes. Sin embargo, según Latado & Neto, 2004, los pedicelos florales tienen la ventaja de ser un tejido fácil y lo suficientemente sensible para ser probado como explante.

En este trabajo con crisantemo, los resultados de la dosis letal 50 (LD50) que ellos obtuvieron después de probar la susceptibilidad y con un análisis de regresión lineal, es de .82%, dejando un antecedente en el cual se puede extrapolar a otras especies. La teoría es que las barreras físicas de los tejidos vegetales, impide que el EMS penetre por completo a los tejidos más internos, sin embargo, ellos probaron que con un tiempo de sumersión de entre 1-2hrs es suficiente para inducir mutagénesis. (Latado & Neto, 2004)

La aparición de sectores quiméricos en plantas después la mutagénesis es muy común. En estos casos, estrategias tales como la poda o la propagación vegetativa son necesarios para aumentar y estabilizar el sector mutado. Después del tratamiento mutágeno, los tejidos cultivados in vitro son quimeras, compuestas por células mutadas y no mutadas y una mezcla de varias mutaciones. Por tanto, es necesario separar varios sectores a través del subcultivo. Debido a que solo unas pocas células, incluso en un meristemo apical organizado, están involucradas en dar lugar a una yema y un brote cada vez que se propaga, la propagación in vitro repetida de los tejidos mutagénicos separa rápidamente tales sectores. Por lo general, tres o cuatro propagaciones después de la inducción se consideran suficientes para lograr esta separación, lo que a menudo se denomina "disolución de una quimera para obtener homohistontos". (Ahloowalia, 1998; Sikora *et al.*, 2011).

Por otro lado, mutantes sólidos estables (no quiméricos) se puede obtener en muchas especies si las plantas se regeneran de brotes adventicios, y si se derivan de uno o algunos tejidos de células somáticas. (Van Harten, 1998; De Jong & Custers, 1986)

En otros ensayos (Yu-Shi Luan, 2007) experimentó con un cultivar de patata (*Ipomoea batatas* L.) tolerante a la sal, en el cual se lograron obtener de una mutación inducida, utilizando etilmetanosulfonato (EMS) en callos de patata, seguido de selección de línea celular y subsiguiente regeneración de la planta.

En otro estudio, semillas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. "Shannong No. 5") fueron tratadas por EMS al 1% durante 12 h, 24 h y 48 h para optimizar la mutagénesis de EMS y determinar la dosis letal media de EMS (1% EMS y 24 h). Después de tratar con EMS al 1% durante 24 h, se cultivaron 541 plantas M1 en invernadero para la investigación del fenotipo. La fertilidad de los pepinos M1 fue muy baja, y solo 79 líneas produjeron semillas después del auto-cruzamiento. Se investigaron 60 familias M2 independientes que comprenden 600 plantas M2 para determinar la alteración fenotípica, y se aislaron 11 líneas mutantes individuales en seis grupos: mutantes de frutos cortos, mutantes de frutos largos, mutantes de flores pequeñas, mutantes de flores grandes, mutantes de zarcillos opuestos y mutantes de hojas agrupadas. Dos representantes seleccionados, mutantes de frutos cortos y mutantes de hojas agrupadas, mostraron una proporción de segregación de 1:3 en las poblaciones M2. Esta proporción es

consistente con el modelo mendeliano clásico, lo que indica que los dos tipos de mutantes pueden estar controlados por un solo gen recesivo, respectivamente. El fenotipo de fruto largo se heredó de forma estable y no se observó segregación en la generación M3, lo que indica que esta línea mutante puede ser homocigótica. (Wang *et al.*, 2014)

Yin Lu, (2016), en brotes de repollo chino (*Brassica rapa L. ssp. pekinensis*) un importante cultivo en china con usos tanto en alimentos frescos como procesados, con un alto valor nutricional; hizo pruebas sobre la influencia de diferentes concentraciones de EMS; generando 142 mutantes con distintas variaciones en la forma de la hoja, color de la hoja, tamaño de corola, color de la flor, tiempo de atornillado y resistencia al mildiú veloso. Fueron identificados a partir de 475 cultivos de micrósporas derivados de Haploides Divididos. Esto con el uso de HRM (High resolution melting) y describieron la rápida generación de mutantes por microsporogénesis de botones florales tratados con EMS. (Yin Lu, 2016)

Meristemos cultivados in vitro de *Rosa hybrida* cv. 'First Red' se utilizaron con varias concentraciones [0, 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0% (v / v)] de etilmetanosulfonato (EMS) para desarrollar mutantes. Dependiendo de la concentración utilizada, se obtuvieron una supervivencia del 50% en micro-brotes pretratados con EMS al 1,0% (v / v) durante 6 horas. Los micro-brotes se utilizaron para una mayor multiplicación de brotes. La tasa máxima de multiplicación de brotes se obtuvo en Medio MS suplementado con diversas concentraciones y combinaciones de 2,0 mg / l B A (6-bencilaminopurina), 0,25 mg / l NAA (ácido 1-naftaleno acético), 100 mg / l Ads (sulfato de adenina), 0,5 mg / l GA₃ (ácido giberélico) y 1.0% (v / v) EMS. Los brotes alargados se enraizaron en medio MS de concentración media suplementado con 0,25 mg / l IBA (ácido indol-3-butírico) dentro de las dos semanas de cultivo. Aproximadamente el 70% de las plántulas enraizadas sobrevivieron en el invernadero. La variación genética se detectó entre las plantas cultivadas in vitro mediante el uso de marcadores RAPD.

El resultado mostró que se obtuvo un polimorfismo del 21,5% entre las plantas cultivadas in vitro. Los mutantes criados in vitro, así como las plantas de control, se cultivaron en macetas. Hubo variación morfológica entre mutante y control. Plantas, con respecto a la altura de las plantas, número de ramas, número de flores, longitud del tallo de la flor, tamaño de la hoja y número de pétalos / flor. (Kumar *et al.*, 2008)

En otro trabajo, Jong & Siguina (2011), realizaron pruebas sobre la eficacia del mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS) para inducir mutaciones en *Saintpaulia*. Secciones de hojas in vitro de *Saintpaulia* cv. 'Crystobal' se expusieron a varios tratamientos EMS al 0%, 0,2%, 0,4% y 0,6% durante 30, 60, 120 y 240 min, tras lo cual se recuperaron brotes adventicios de los explantes tratados. Los brotes que producían al menos seis hojas se indujeron a enraizar y las plántulas resultantes se trasplantaron al suelo. Se cultivó un total de 1838 plántulas hasta la etapa de floración y se identificaron 10 mutantes. Cuatro de los mutantes eran quimeras de hojas abigarradas y los seis restantes presentaban variaciones a nivel de color y / o flecos de flores. Los resultados del presente estudio mostraron la eficacia de EMS para inducir la mutación in vitro de *Saintpaulia* y el método se puede utilizar en el futuro para ayudar a la reproducción en esta popular planta ornamental.

El método más comúnmente utilizado para identificar mutaciones en una población TILLING es mediante el sistema Li-Cor, además de ser todas variedades mejoradas mediante la inducción con EMS (tabla 5). Se basa en la escisión específica de bases mal emparejadas formadas como resultado de la fusión repetida y el recocido de un producto de PCR amplificado a partir de una región de interés. Si hay una mutación, se generará una molécula de ADN híbrida con un solo desajuste. Luego se escinde selectivamente con una endonucleasa, típicamente Cel-1 o Endo-1, produciendo dos fragmentos más cortos que pueden separarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Colbert, Till, & Tompa, 2001). Mediante la incorporación de etiquetas colorantes fluorescentes de diferentes colores en los cebadores de PCR directo e inverso, los fragmentos amplificados pueden identificarse mediante el instrumento Li-Cor. Un solo Li-Cor puede ejecutar un gel de 96 carriles y la sensibilidad es lo suficientemente alta como para permitir un agrupamiento de muestras de hasta 16 veces, lo que totaliza 768 muestras por corrida en organismos diploides.

Tabla 5: Algunas especies en horticultura trabajadas con EMS.

Especie	Año	Mutágeno	Tasa de mutación	Método de validación	Referencia
Lotus japonicus	2003	EMS	1/502 Kb	Li-Cor	(J.A. perry & L Wang, 2003)J.
Arabidopsis	2003	EMS	1/208 Kb	Li-Cor	(B.J. Till, Reynolds, & Greene, 2003)
Barley	2004	EMS	1/1 Mb	dHPLC	(McCallum, Shaw, Muehlbauer, Marshall, & Waugh, 2004)
Maize	2004	EMS	1/485 Kb	Li-Cor	(B.J. Till, Reynolds, & al., 2004)
Bread wheat	2005	EMS	1/24 Kb	Li-Cor	(A.J. Slade, Fuersten, Loeffler, Steine, & Facciotti, 2005)
Rice	2007	EMS	1/294 Kb	Li-Cor	(Till, Cooper, & al, 2007)
Pea	2007	EMS	1/669 Kb	Li-Cor	(Triques, Sturbois, & Gallais, 2007)
Medicago	2009	EMS	1/485 Kb	Li-Cor	(Signor, Savoio, & Aubert, 2009)
Sunflower	2011	EMS	1/475 Kb	Li-Cor	(Sabetta, Blanco, & Montemurro, 2011)
Rose First red	2008	EMS	1/200 Kb	RAPD	(Kumar Senapati & Ranjan Rout, 2008)

Planteamiento del problema

Al pasar de los años y consecutivas búsquedas de cultivares elite en *Eustoma grandiflorum*, se han obtenido variedades con estabilidad genética y de características apreciables para el consumidor, sin embargo, al ser una planta de reproducción sexual, con el uso de semillas no se mantiene una homogeneidad en el genotipo, por lo que la clonación y el cultivo de plántulas es el principal método para este cultivo. Tomando en cuenta este panorama, el uso de agentes químicos para la inducción de variabilidad genética y su posterior cultivo *in-vitro* es una herramienta de amplio uso y resultados tangibles en todos los especímenes que se han tratado, por lo que el trabajo aquí hecho, consistió en usar el EMS como agente mutagénico con la intención de obtener variedades de interés agronómico y trabajar en ellas a nivel de M2 ya en invernadero para obtener variedades estables en su genotipo y favorecer la obtención de nuevos cultivares de dicha flor.

Justificación

Las flores constituyen no solo una parte importante de nuestra cultura, son además un mercado que ha tomado importancia a nivel global y es importante en la economía mexicana.

- ▶ El lisianthus es una especie ornamental poco conocida en México, probablemente porque no se cultiva en grandes extensiones, es de gran valor comercial y ha crecido su demanda los últimos años.
- ▶ La mejora de los cultivos y la alternancia en las especies puede mejorar las condiciones de este mercado.
- ▶ Dentro de las mejores opciones para inducir variabilidad genética ha sido el uso de agentes mutagénicos para generar nuevas variedades de interés comercial; tanto químicos como físicos.

Hipótesis

Las mutaciones puntuales provocadas por la exposición al EMS provocarán un cambio en el genotipo, a nivel de traducción o eliminación de sectores de ADN, de esta forma podrán ser expresados y caracterizados en cuanto a su fenotipo, obteniendo así nuevas variedades y genotipos más amplios. Por otro lado, la obtención de brotes a partir de organogénesis favorecerá la estabilidad de dichas mutaciones evitando en lo posible la aparición de sectores quiméricos, faltando aun una segunda generación (M2) de la que se podrán seleccionar los genotipos con las características deseadas y con un genotipo estable.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la dosis letal media del EMS y su tasa de efectividad para la obtención de variantes genéticas en cultivares de *Eustoma grandiflorum*

Objetivos específicos

- Evaluar la dosis letal media el EMS.
- Cultivo *in-vitro* para la regeneración de brotes para obtener plantas sin sectores quiméricos.
- Caracterizar el fenotipo de los cultivares de *Eustoma Grandiflorum* sobrevivientes a la exposición con EMS.

Materiales y métodos

De acuerdo con la bibliografía y tomando en cuenta los resultados obtenidos en mutagénesis en distintas especies, sobre todo en flores; las dosis requeridas para la inducción de mutantes varían de acuerdo con la especie, el material que se someterá a la mutagénesis, tiempo y concentración.

EMS:

En cuanto al EMS, se usó la marca SIGMA®

Materia vegetal:

Se utilizaron semillas de retro cruza de *Lisianthus*, se determinó la dosis letal media usando el protocolo de petunia (Amanda, 2008), Las variedades obtenidas son 4 autógamas, de diferentes cruza y para tres de ellas se desconoce su fenotipo.

DMSO:

Según (Anil, 1976) el uso de DMSO (dimethyl sulfoxido), incrementa la absorción y penetración dentro de los tejidos de drogas y otros químicos disueltos, además de que facilita su lavado y eliminación posterior del tejido. Por ello y debido a que en otros estudios se necesitó de muchas horas en inmersión para tener la seguridad de haber inducido la mutación además de que ello puede provocar daño fisiológico; en este trabajo se usó el DMSO al 2% para reducir el tiempo de exposición y facilitar el lavado y eliminación del EMS al final del tratamiento.

Medio de cultivo organogénesis directa:

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con 3gr/L de sacarosa y 8gr/L agar SIGMA® para la germinación; para el desarrollo y crecimiento de los explantes obtenidos la diferencia fue solo en la concentración de sacarosa, 30gr/L. Para la obtención de callos y organogénias directa, es decir, obtención de brotes, se trabajó con el medio MS, con 3gr/L de sacarosa y una concentración de fitohormonas de 0.5mg/L indol-3-acético (IAA), 1.5mg/L Benzylaminopurina (BA), 0.5mg/L ácido giberelico (GA₃). Todos los medios fueron preparados con agua destilada y desionizada y pH ajustado a 5.8 con NaOH o HCl 1 N en un potenciómetro Sargent-Welch. Los medios fueron esterilizados en una autoclave de vapor a 1.05 kg/cm² durante 15 min y vertidos posteriormente en cajas Petri de plástico de 55 x 15 mm.

Estadística: Se aplicó statgrafics software, para el análisis estadístico, donde se aplicaron intervalos de confianza del 95%, en diámetro floral, altura de plantas y diámetro de tallo.

Metodología EMS semillas modificado del protocolo de (Amanda S. Berenschot, 2008) en petunia.

1. Se seleccionaron 50 semillas de 4 genotipos (C40, C43, C74 y C83) para el experimento las cuales se colocaron en tubos eppendorf de 1.5mL, rotulados y estériles.
2. Por cada genotipo hubo un duplicado por tiempo y concentración, en total fueron 10 tubos eppendorf con las diferentes concentraciones y el control por 1 y 2 horas, 30 en total por genotipo.
3. Previo, con una jeringa y un filtro de 20uM se filtró el EMS concentraciones usadas y se colocó en un matraz estéril; de ahí en 4 matraces estériles se hicieron las diluciones con DMSO al 2% para obtener las 4 concentraciones con las que se (.25M-.5M.75M-1M), con tres repeticiones por cada concentración.
4. Se puso 1.5ml de EMS con la concentración indicada en cada tubo rotulado de todos los genotipos.
5. Se pusieron en un contenedor y en agitación a 300 rpm a 26° durante los tiempos seleccionados
6. Los eppendorf que cumplieran su tiempo, (1h-2h) se retiraban del shaker y se procedía al lavado de las semillas.
7. El lavado de semillas fue el siguiente:
 - a) Lavado con alcohol al 70% por 5 min
 - b) Lavado con cloro al 30% por 3 min
 - c) 5 lavados con agua estéril por 1minSe vacían las semillas en cajas Petri con medio de germinación

Tabla 6: Tratamientos y tiempos para cada genotipo utilizado

50 semillas	
tiempo	EMS Mol
	0 (control) Agua
60 min	.25M
120 min	.50M
	.75M
	1M

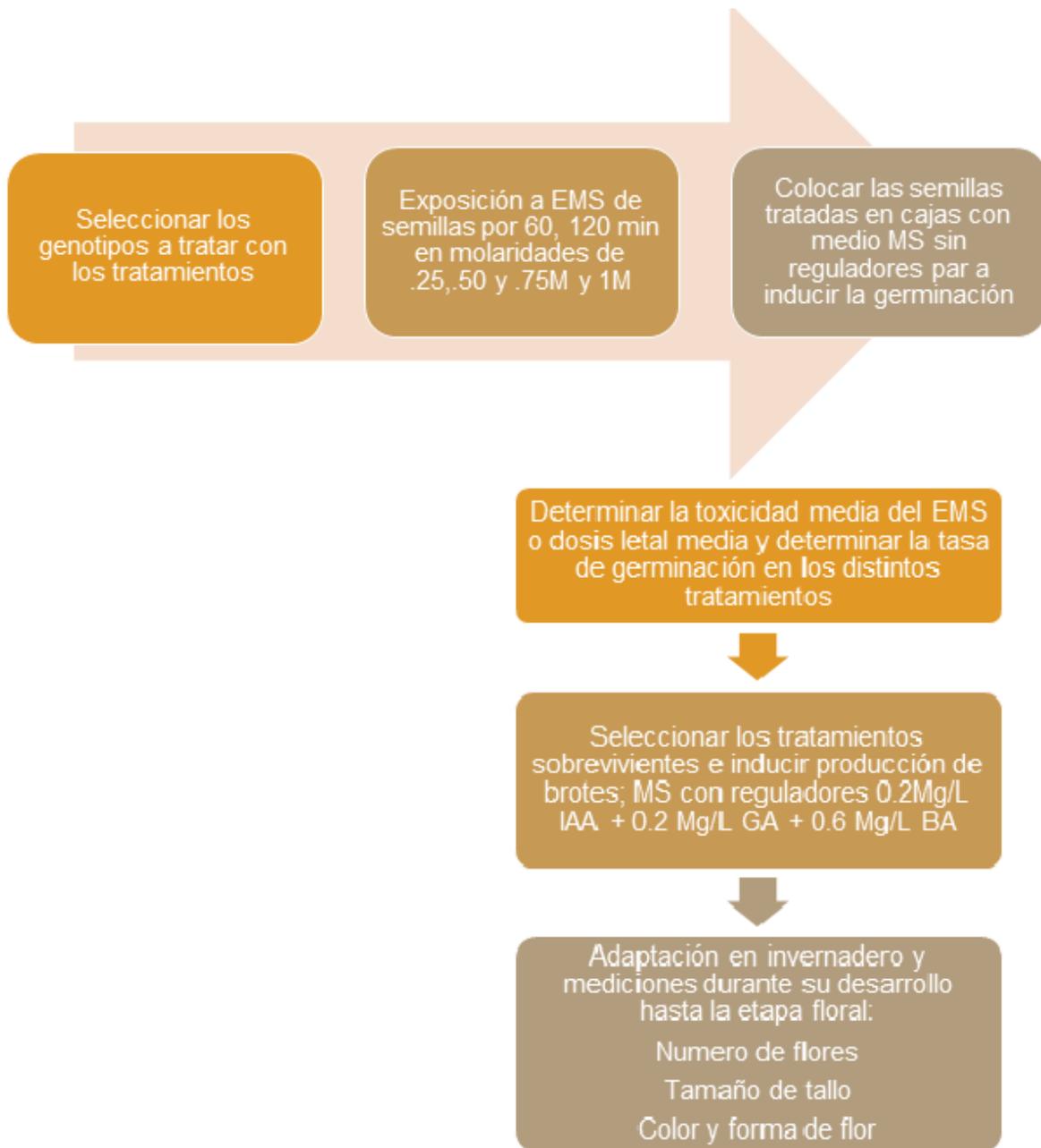


Figura 8: Esquema general de la metodología seguida en este experimento.

Resultados

Germinación de semillas.

La primera fase, germinación con diferentes niveles de EMS nos dio el resultado esperado en la bibliografía primero describe que sucedió con tus tratamientos en cuanto a la germinación y después hacer referencia los que la literatura te indica. Un descenso proporcional de la cantidad de semillas germinadas y no todas fueron viables hasta plantas maduras, aunque es claro la toxicidad del EMS en concentraciones cercanas a 1M sometidas a una hora del tratamiento. En .25M fue mayor al 60% la germinación, en contraparte de 1M, donde menos del 1% germino (tabla 7).

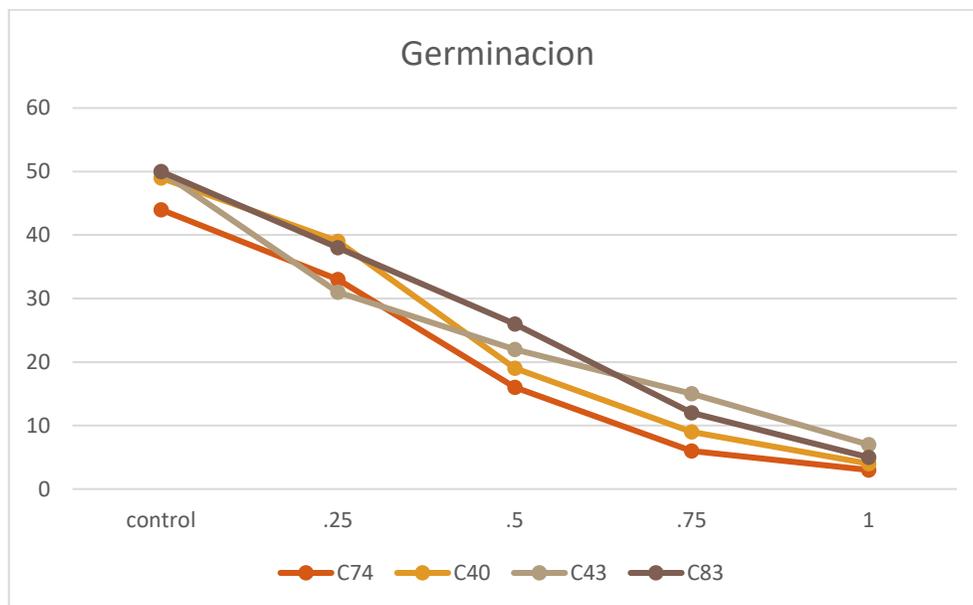
En cuanto al tiempo (Latado & Neto, 2004) obtuvo resultados en sus experimentos con 1-2 horas de tratamiento, dependiendo de la difusión del químico a través de los tejidos vegetales; así que tomando en cuenta sus resultados llegamos a la conclusión que 2 horas es demasiado toxico para las semillas llegando a ser nula la germinación, ya sea porque solo es la barrera de la cutícula del embrión o por el diminuto tamaño de la semilla, 1-2 mm.

Tabla 7: Total de semillas germinadas; control: agua, EMS en 4 concentraciones.

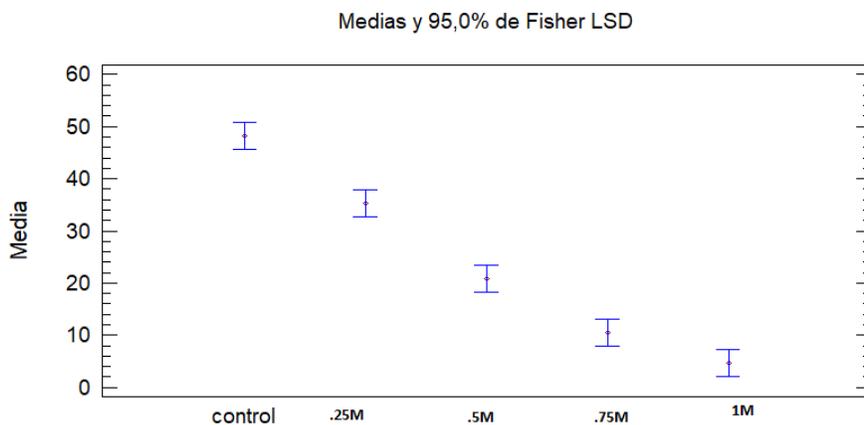
25 SEMILLAS POR CADA DUPLICADO/ 50 TOTAL

GENOTIPO	Concentración EMS molar/germinación					
	1 hora			2 horas		
	control	.25 M	.5 M	.75 M	1 M	.25,.5,.75,1
C74	44	33	16	6	3	0
C40	49	39	19	9	4	0
C43	50	31	22	15	7	0
C83	50	38	26	12	5	0

La progresión lineal en el descenso de semillas germinadas se observa claramente en la gráfica 1, donde todos los genotipos tuvieron un comportamiento parecido, aun es más visible en la gráfica 2 (medias de Fisher,0.95%) donde todos los procesos de toxicidad al aumentar la concentración de EMS son proporcionales a la tasa de germinación.



Grafica 1: Porcentaje de germinación en semillas de lisianthus tratadas con diferentes concentraciones de EMS (Molaridad).



Grafica 2: Medias 0.95% Fisher, descenso en proporción a la toxicidad del EMS(Molaridad).

La toxicidad del EMS es notable en la figura 9. Siendo que el tiempo de exposición fue de 1h en comparación a otros trabajos, el uso del DMSO fue un factor importante, pues en nuestros resultados, aun con la concentración más baja de .25M, 120 minutos de exposición al EMS es fatal para las semillas. Parte de ello pudiera ser por su tamaño, por lo que la variable de probar estas concentraciones y tiempo de exposición con un explante debería ser diferente. En todo caso es notable la germinación nula y en algunos casos como en .5M (figura 9 C) que, aunque hubo poca germinación, el tamaño de la plántula es mucho mayor, con hojas más anchas, incluso comparando con el control, a simple vista se aprecia una diferencia.

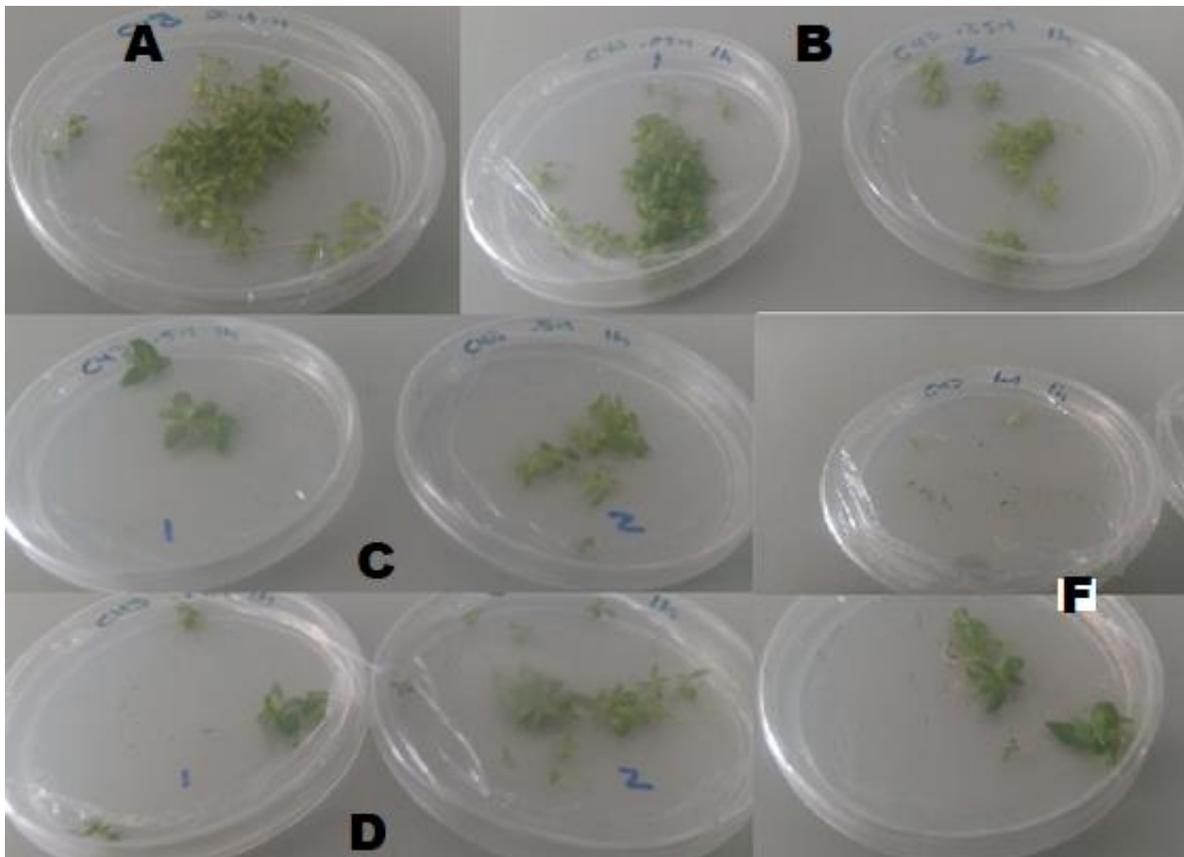


Figura 9: Germinación en semillas del genotipo C43 tratadas con diferentes concentraciones a) control, b) .25M, c) .5M, d) .75M F) 1M de EMS.

Dosis letal media

La dosis letal media, es el porcentaje donde la mitad de las semillas mueren o germinan. La causa de muerte es un proceso toxico que les impide el desarrollo.

Como se había explicado antes, para obtener una población TILLING, lo primero es establecer la curva de muerte o dosis letal media, donde el objetivo es estandarizar y saber en qué concentración obtenemos de un 30%-80% de supervivencia (Sikora *et al.*, 2011).

Además de la toxicidad del EMS nos enfrentamos a la semilla en un proceso de estrés y desgaste con los lavados tanto en cloro como en alcohol, pues la asepsia es vital para evitar la contaminación *in-vitro* de los germinados.

En todos los genotipos se obtuvo una alta tasa de germinación hasta .5M, donde es de poco menos del 40% en C74, C40 Y C43. En C83 se obtuvo el 50% de germinación (tabla 8)

En las concentraciones de EMS de .75M Y 1M, la tasa de muerte es superior al 60%, dejando claro el grado de toxicidad que este representa. Estas concentraciones pueden tener un valor ambivalente, pues esto quiere decir que la alta tasa de mutagénesis resulto mortal, sin embargo, si las plantas superan todos los pasos hasta su floración, la probabilidad de que encontremos cambios fenotípicos notables es alta.

Ya en la gráfica 3, notamos como la curva de la dosis letal media es casi una recta, puesto que a mayor concentración mayor la tasa de toxicidad y de manera perpendicular, conforme aumenta la concentración del EMS el porcentaje de muerte es mayor. En las concentraciones .25M Y .5M es donde hay mayor sobrevivencia.

Ninguno de los genotipos hasta esta fase tuvo pérdidas más allá de la ya comentada reducción de germinación por la toxicidad. Se recuperaron todas las plántulas germinadas y se traspasaron a frascos para su crecimiento vegetativo.

Tabla 8: Dosis letal media de germinación después de la exposición al EMS.

	C74	# de semillas	germinacion	inviabiles	% germinacion	% LD 50
C74	control	50	44	6	88%	12%
	.25M	50	33	17	66%	34%
	.5M	50	16	34	32%	68%
	.75M	50	6	44	12%	88%
	1M	50	3	47	6%	94%
	C40	# de semillas	germinacion	inviabiles	% germinacion	% LD 50
C40	control	50	49	1	98%	2%
	.25M	50	39	11	78%	22%
	.5M	50	19	31	38%	62%
	.75M	50	9	41	18%	82%
	1M	50	4	46	8%	92%
	C43	# de semillas	germinacion	inviabiles	% germinacion	% LD 50
C43	control	50	50	0	100%	0%
	.25M	50	31	19	62%	38%
	.5M	50	22	28	44%	56%
	.75M	50	15	35	30%	70%
	1M	50	7	43	14%	86%
	C83	# de semillas	germinacion	inviabiles	% germinacion	% LD 50
C83	control	50	50	0	100%	0%
	.25M	50	38	12	76%	24%
	.5M	50	26	24	52%	48%
	.75M	50	12	38	24%	76%
	1M	50	5	45	10%	90%

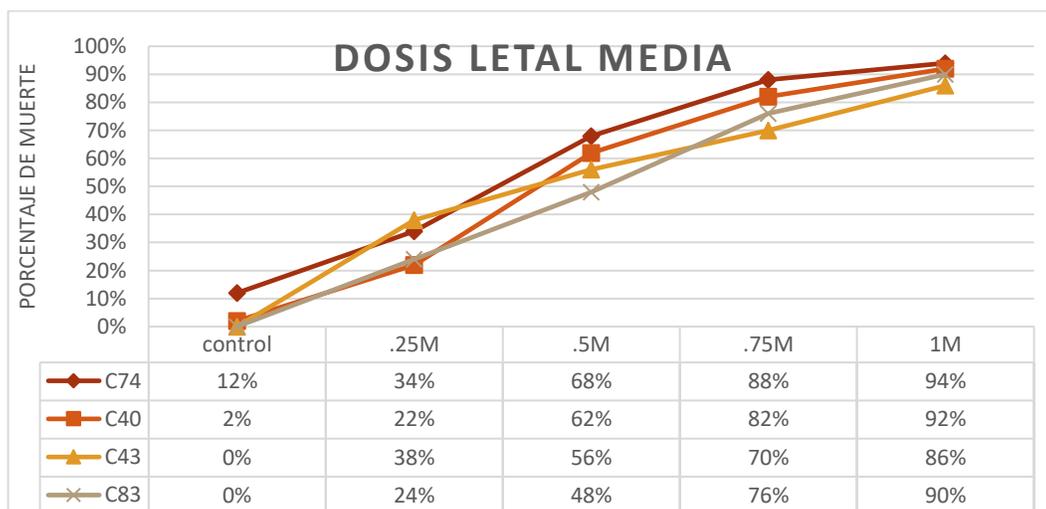


Gráfico 3: Curva de muerte de los genotipos C43, C40, C74 Y C83 con respecto a las concentraciones de EMS (Molaridad). La dosis letal media esta en .5M (EMS) donde hay una proporción 1:2 muerte-germinación.

Crecimiento vegetativo *in-vitro*:

Después de la germinación se traspasaron las plantas sobrevivientes a frascos donde se crecieron para su posterior obtención de clones mediante organogénesis directa. Se mantuvieron en medio de crecimiento el cual consistía en: medio MS, 30 gr/L sacarosa y 8gr/L de agar.

El siguiente paso consistió en el crecimiento vegetativo del germinado, pasando cada plántula a frascos con medio estándar MS para su desarrollo, dejando ver que, durante el desarrollo, mientras más concentración había recibido del EMS mayor eran las aberraciones fenotípicas que presentaban; raíces aéreas, crecimiento atípico o deformidad, plantas raquílicas y enclenques, algunas muerte o nulo desarrollo de estructuras primarias como tallo y hojas (figura 10). Según Auerbach(1949) y Per Sikora A (2011), todas estas aberraciones son quimeras y mutaciones puntuales que tuvieron una repercusión negativa en la fisiología de la planta, dejando claro la toxicidad del EMS y como a mayor concentración dichas quimeras provocan un crecimiento aberrante.

En el genotipo C43 (figura 10) es notable la disminución en el tamaño de las plántulas y su desarrollo a mayor concentración (1M). con una raíz pequeña y única, sin raíces secundarias, además de un desarrollo aberrante, con hojas en desorden y sin aparente crecimiento apical. Incluso en .75M y 1M el desarrollo es tan en desorden que es imposible notar un tallo como tal y algunas de las hojas además de ser pequeñas parecen tener clorosis pues es claro su color amarillento. En estas concentraciones el daño genético fue tal que las quimeras son reconocibles.

Las plántulas en .25M y .5M, hasta donde se considera la dosis letal media en comparación a las últimas concentraciones, poseen una altura doble, además de un desarrollo normal dentro de los parámetros. Tallo desarrollado, crecimiento apical, raíz primaria y secundarias. Hojas largas y crecimiento en par y alternadas, de color verde claro. Aparentemente normales y sin problemas en su desarrollo vegetativo primario. Aquí habría esperar hasta su madurez y floración para corroborar alguna mutación favorable.

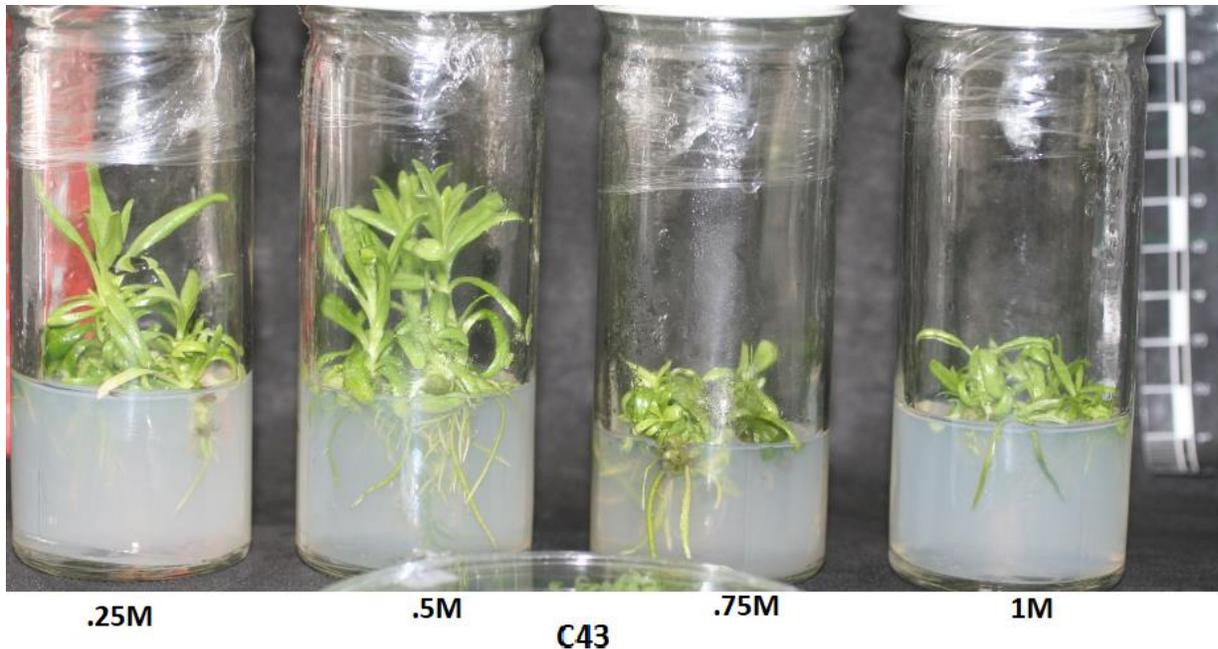


Figura 10: Genotipo C43, 15 días después de la exposición a diferentes concentraciones EMS. A mayor concentración mayor las aberraciones o quimeras en el desarrollo de la planta.

En la figura 11 tenemos una diferencia pírrica pero notable; el arrosamiento de la plántula es mayor que en el genotipo C43. La plántula tanto en las concentraciones bajas como en las más altas, no se nota el desarrollo de un tallo alargado ni un crecimiento apical notable. El tallo es grueso y más pequeño, Además, es visible que en .5M también hay una aberración quimérica, un desarrollo nulo en algunas de las plantas, lo que indica que, con todo y la germinación positiva, la toxicidad del EMS fue muy alta, llegando a ser negativa e influir en un mal desarrollo de la planta.

Esta variedad fue muy susceptible al EMS; pues se nota ya en .25M las plántulas en la imagen izquierda, una hoja más redonda y pequeña, y del lado derecho hojas alargadas, ambas con crecimiento en roseta, alternadas y en par, necesitando más tiempo de desarrollo que las otras cepas para su alargamiento. Incluso en 1M, de manera curiosa se nota que el alargamiento fue mayor y en menor tiempo que en las otras concentraciones, sin ser una manera metódica de compararla, sin embargo, es visible ya un tallo alargado y una creciente apical.

El desarrollo de raíces aéreas en .75M también es una característica vista en otras variedades implicada la alta concentración de EMS, arriba de .5M.

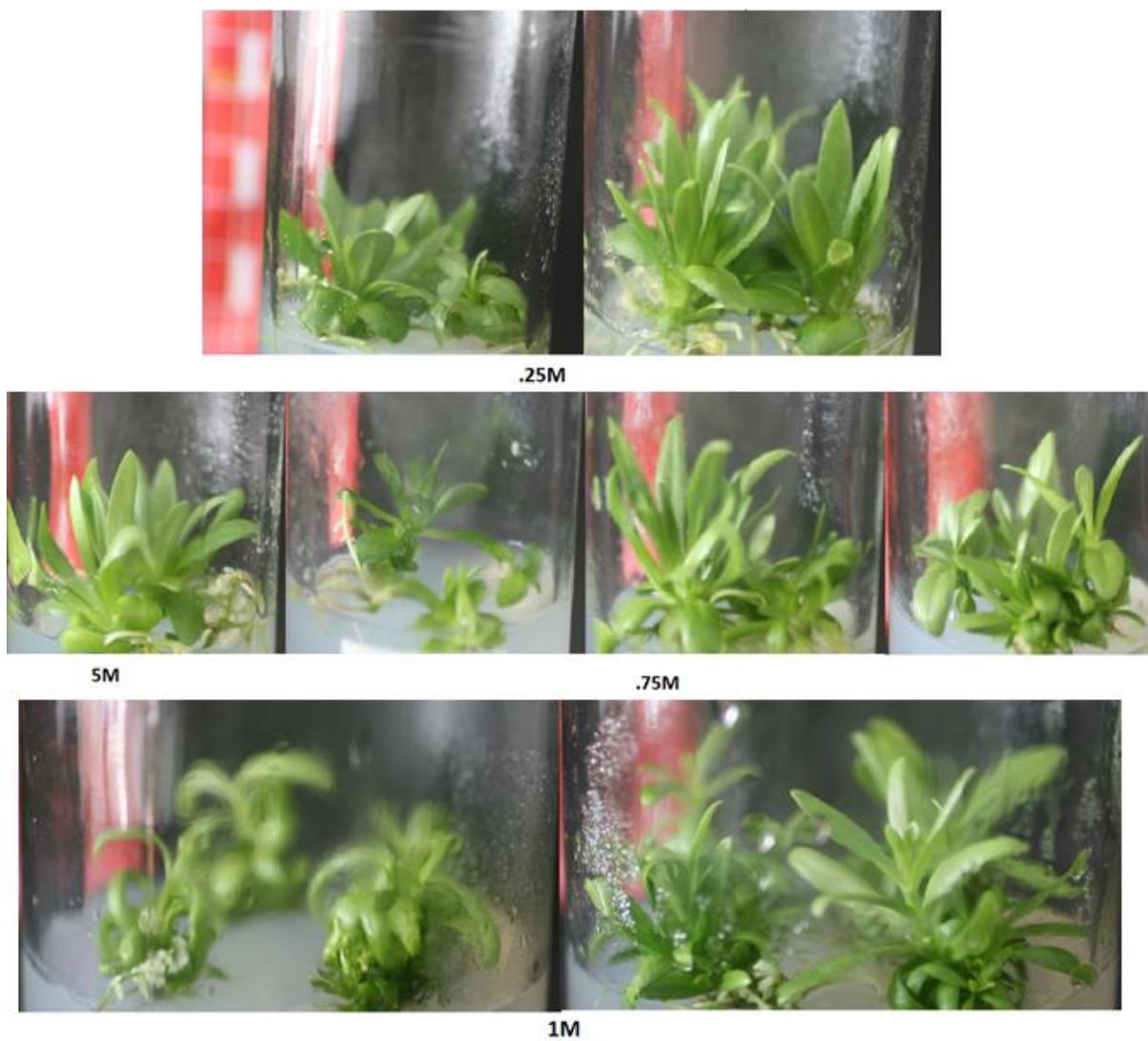


Figura 11: Genotipo C74 en crecimiento 15 días después de la exposición al EMS. Notables aberraciones quiméricas en concentraciones .5M, .75M Y 1M.

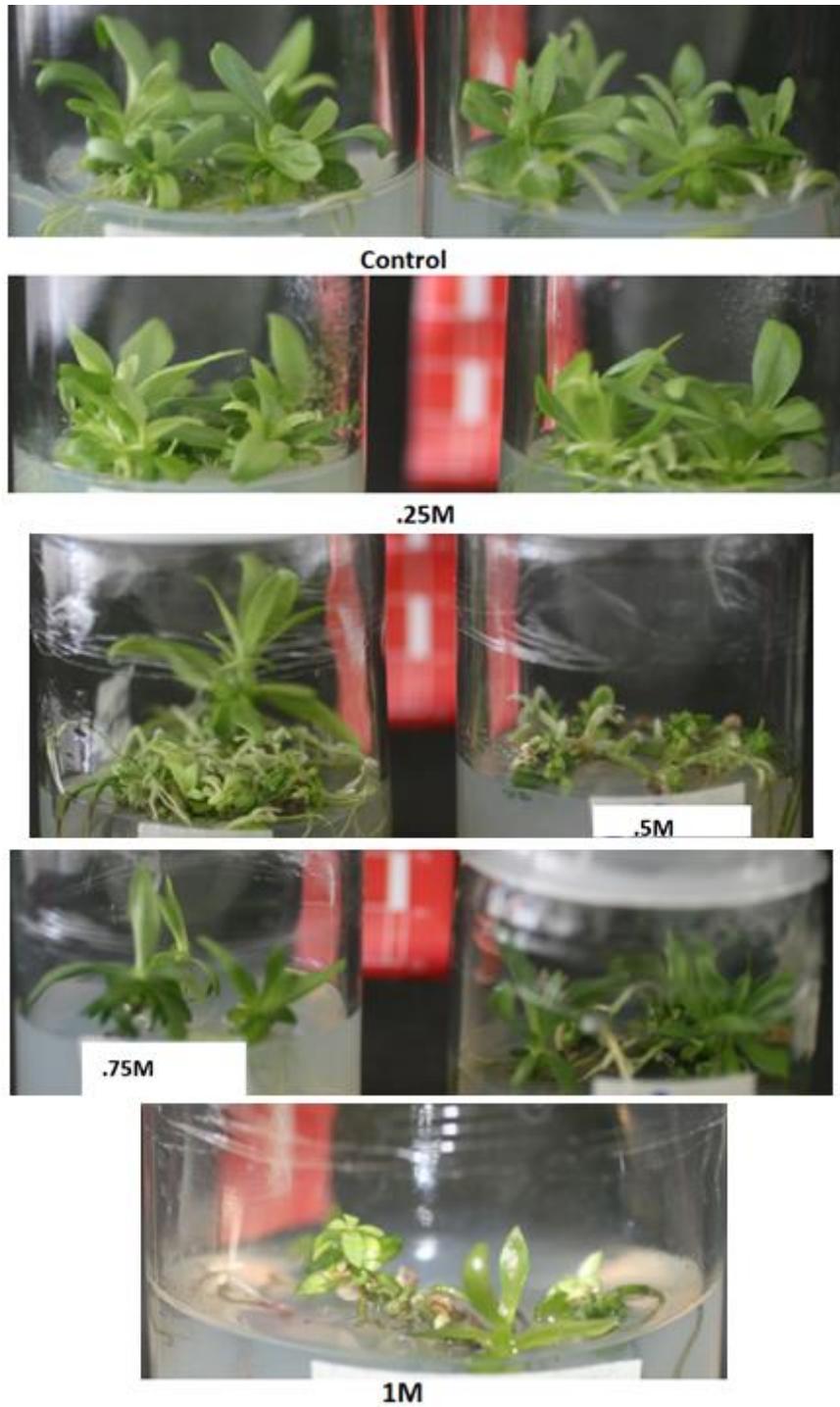


Figura 12: Genotipo C83, 15 días en crecimiento después de la exposición al EMS. Variedad con mayor susceptibilidad al EMS. Notable las aberraciones a partir de .5M de EMS.

El genotipo C83 fue el más susceptible al EMS, llegando a ser tóxico en concentraciones a partir de .5M, incluso siendo el genotipo con la dosis letal media más baja en esta concentración; es decir, obteniendo un mayor número de semillas germinadas y hasta cierto punto el de mayores plantas puestas en crecimiento vegetativo; fue por mucho en el que más se observó una clara toxicidad, provocando crecimientos aberrantes. Como se observa en la figura 12, en control y .25M las plantas parecen tener características similares: crecimiento en roseta, hojas largas, pares y alternadas, sanas en cuanto al color y de tamaño parecido. Las plantas parecen ser tan semejantes que se deduce no hubiera un cambio mutagénico en el fenotipo.

En la concentración .5M de EMS ya es notable una diferencia en el desarrollo. Solo una planta parece haber obtenido una ventaja adaptativa, pues en el mismo tiempo el desarrollo fue mayor, se alargó el tallo y el crecimiento apical es sobresaliente incluso con el control y .25M de EMS. Sin embargo, las demás plantas presentan un desarrollo nulo de hojas, raíces aéreas, clorosis en las pocas hojas visibles y solo una raíz primaria en el medio. Es notable la aberración en el desarrollo.

Llamativo caso es la concentración .75M, pues en este parece haber más desarrollo; menos que en las concentraciones más bajas, pero es notable plantas semidesarrolladas, de crecimiento lento y enanas. Algunas pocas raíces aéreas, pero hojas alargadas y en roseta. La raíz primaria en el medio y con raíces secundarias. Aunque algunas de las plantas no se desarrollaron, hay más posibilidad de rescatar hojas para la organogénesis.

En 1M, la toxicidad es alta, casi al límite de ser totalmente muerte. Hay pocas plantas, sin embargo, hay desarrollo de algunas hojas, raíces aéreas. Desarrollo aberrante, plantas muy pequeñas, y con pocas hojas, pequeñas por igual y sin desarrollo. Incluso algunas de las hojas parecen tener un color diferente e insano.

Inducción de brotes

En esta etapa, Ahloowalia, 1998 & Sikora *et al.*, 2011, dicen que la propagación vegetativa y la poda son necesarios para aumentar y estabilizar el sector mutado. Después del tratamiento con EMS, los tejidos cultivados *in-vitro* son quimeras, compuestas por células mutadas y no mutadas y una mezcla de varias mutaciones. Por tanto, es necesario separar varios sectores a través del subcultivo. Debido a que solo unas pocas células, incluso en un meristemo apical organizado, están involucradas en dar lugar a una yema y un brote cada vez que se propaga, la propagación *in-vitro* repetida de los tejidos mutagénicos separa rápidamente tales sectores.

El proceso de inducción de brotes por hoja lleva un tiempo de entre 13-15 días (figura 13), son claros los sectores donde comienza a formarse el callo, ya por la base o la orilla de la hoja. Muchas de las hojas no fueron capaces de formar callo murieron rápidamente.

Las hojas que son capaces de generar la des-diferenciación pueden ser los sectores quiméricos que si hay en ellos una mutación y que pueda quedar homogenizada en el brote.

La tasa de contaminación fue baja, sin embargo, la cantidad de hojas que fueron capaces de producir brotes no fue la deseada. Hay dos factores que pudieron haber afectado, la mutación que provocará alguna falla o la incapacidad de generar callos, y todo el proceso de corte de la hoja y estrés al momento de ponerlo en el medio de inducción.



Figura 13: Inducción de brotes.

Posterior a la inducción de brotes, lo siguiente fue el rescate de los brotes. Con sumo cuidado al ser muy pequeños y endebles, se colocaron en cajas con medio de crecimiento (MS + 30gr Sacarosa) y su mantenimiento durante un tiempo de 15-20 días, hasta que tuvieran 4 hojas verdaderas y raíz primaria y secundarias visibles (figura 14 y 15).

Cada brote rescatado carecía de raíz y por consiguiente el objetivo principal era generar una raíz fuerte y capaz de soportar el cambio y la adaptación del cultivo *in-vitro* al traspaso a la tierra en bandejas multiceldas o “plugs”



Figura 14: Rescate y crecimiento de brotes obtenidos por organogénesis directa después de ser tratados con EMS (C83).



Figura 15: Después de que los brotes han crecido y fortalecido lo suficiente (15-20días), se pasan a charolas de aclimatación donde conservar la humedad y la temperatura son esenciales para evitar el estrés y la muerte de la planta (C83).

Al poseer ya una raíz visible, la adaptación a condiciones de invernadero es la más delicada. Ya que, en condiciones de caja la humedad es arriba del 90%, y en tierra, con ventaja de invernadero para cuidar las condiciones, es de en entre 50%-60 % de humedad.

Con todo el sustrato al que se trasplanto se esterilizo antes de traspasar las plantas.

Cada planta necesita ser separada en el medio sin dañar mucho la raíz, lavar para evitar residuos de medio y contaminación y colocar en las charolas. Se mantuvieron cubiertas dentro de un cuarto de aclimatación a 25°C y ciclos de luz- sombra de 12h.

Hasta este punto el genotipo del que se habían obtenido menos plantas fueron los C70 Y C40, pues en todas las concentraciones se obtuvieron en promedio menos de la mitad de los brotes rescatados (tabla 9). Incluso en control el traspaso del cultivo *in-vitro* a tierra no es el más satisfactorio, pues se perdieron cerca del 50% de los genotipos C40 y C74. Y aunque un porcentaje mayor de plantas se obtuvieron de C43 Y C83, el promedio es parecido (grafica 4). 1M, se recuperaron todos los brotes rescatados.

Tabla 9: Número de plantas adaptadas por genotipo y por concentración de EMS usado

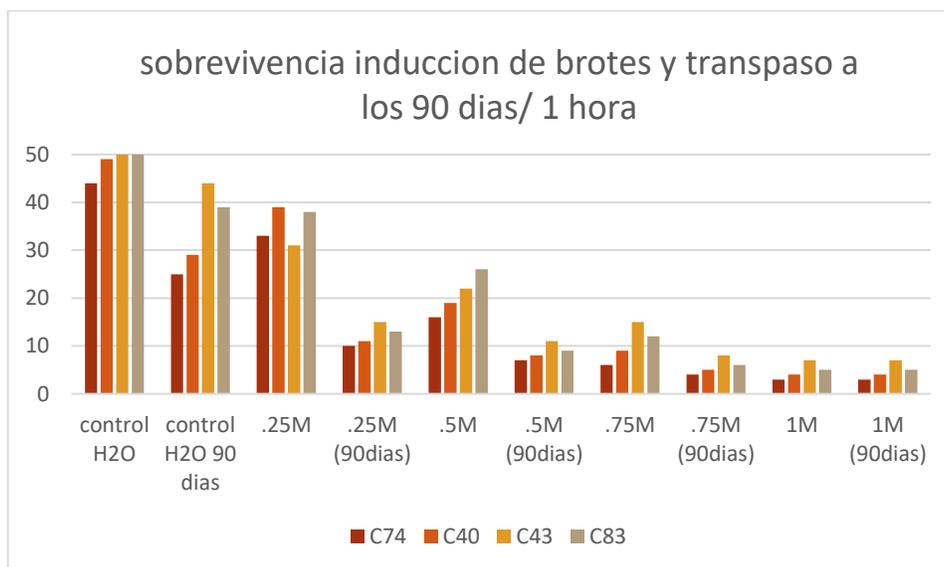
sobrevivencia induccion de brotes y transpaso a los 90 dias/ 1 hora										
	control H2O	control H2O 90 dias	.25M	.25M (90dias)	.5M	.5M (90dias)	.75M	.75M (90dias)	1M	1M (90dias)
C74	44	25	33	10	16	7	6	4	3	3
C40	49	29	39	11	19	8	9	5	4	4
C43	50	44	31	15	22	11	15	8	7	7
C83	50	39	38	13	26	9	12	6	5	5

Adaptación y traspaso a invernadero.

La mayor parte de las plantas se perdió en el proceso de in-vitro/ ex-vitro. Este proceso de adaptación de multiceldas en las que estuvieron de 4-6 semanas, a invernadero, consistió sencillamente en retirar la tapa de los “plugs” y dejar en invernadero bajo aspersores; sin embargo, la sobrevivencia en este punto a factores bióticos como algas y hongos es primordial. Solo lleva 7 días hasta que la raíz es fuerte y antes de que se enrede y pierda vigor se traspasó a cajas con sustrato.

Hubo diferencias en desarrollo en relación al tiempo y tamaño, puesto que las más aptas se desarrollaron rápido y hubo que sacarlas rápido de la charola. Hubo otras como los genotipos C40 y C74 que tuvieron un mayor problema a la hora de la adaptación, y como lo muestra la gráfica 4, fueron los dos genotipos que más perdieron mutantes en el proceso de traspaso.

Al final del proceso el genotipo C43 tuvo la mayor sobrevivencia de mutantes y por ende la posibilidad de estudiar más a detalle los posibles cambios fenotípicos que pudieron haber ocurrido y que nos darían la pauta de selección, siendo más prolífico al tener una mayor población de sobrevivientes y por tanto de posibilidades (grafica 4).



Gráfica 4: Antes y después de la organogénesis. 90 días al sacar del cultivo *in-vitro*.

Invernadero.

Variedad C43.

Flores.

En esta etapa, se mantuvieron las plantas durante aproximadamente 4-5 meses, siendo este genotipo (C43) el más estable y con mejor adaptación, incluso en control, donde se logró obtener una mayor número de plantas y con ello favorecer la comparativa en datos. En control, la germinación, adaptación y desarrollo en invernadero fue directa, sin la inducción de brotes, por lo que los fenotipos obtenidos son los que las semillas ofrecen. Dejando claro su alta variabilidad y en algunas como la 8-9 (figura 16) baja calidad de la flor y poca durabilidad, pues se marchitan rápidamente. Hubo tonalidades de púrpura y la flor, aunque la mayoría fueron compuestas, no tuvieron semejanza genética. De todas solo hubo un fenotipo lavanda (tabla 10).

En el tratamiento .25M de EMS; el cambio más notable fue en la flor 13 (figura 17), que sale de las características de las demás, y muestra una flor a calidad y un color divergente a los demás. Hubo otras como la 3,5, que mostraron baja calidad de la flor y desarrollo de los pétalos que no abrieron por completo, pudiendo ser parte de una mutación no deseada. La 6 tuvo incluso menos apertura de sus pétalos. En este fenotipo la 10,11,12 (figura17) son clones lavanda.

*Tabla 10: Tipo y color de flor obtenido por tratamiento con EMS. C40 Y C74 no se obtuvieron plantas maduras. C43(P-púrpura, L-lavanda, S-simple, C-compuesta, *B-blanca)*

<i>Genotipo</i>	<i>Tratamiento (EMS)</i>	<i>Total plantas</i>	<i>Flor: color/tipo</i>
<i>C43</i>	Control	9	5 P/C, 3P/S, 1L/C
	.25M (3clones)	14	6P/C,4P/S, 6L/C, 1-B*
	.5M (10 Clones)	20	2P/C, 5P/S, 10L/C
	.75M (1 clon)	8	2P/C, 3P/S, 3L/C
	1M (1 clon)		3P/C, 2P/S, 1L/C

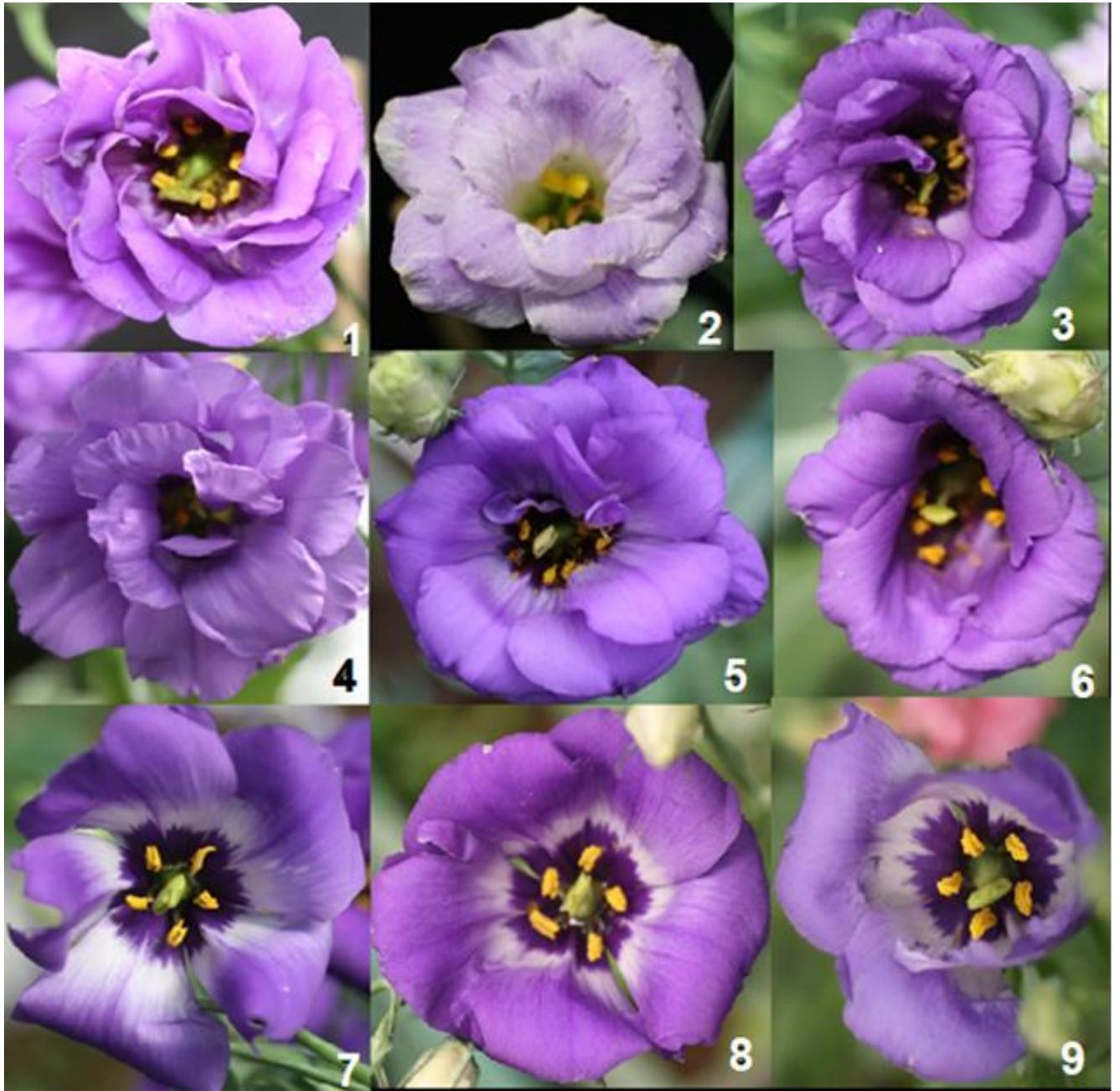


Figura 16: Control, variedad C43



Figura 17: Tratamiento .25M de EMS, variedad C43

Dentro de los tratamientos él .5M de EMS, fue en el que más plantas se obtuvieron. Esto inherente a que fue favorable la organogénesis en este tratamiento, que fue la dosis letal media, y con ello se obtuvieron 10 clones (tabla 10). Los cuales son: 1, 10 y 11, de flores simples, purpuras y mal desarrolladas, notables afecciones por causa del EMS. Flores 6 y 8, lavanda, de flor compuesta, abierta y semejantes, sin quimeras en la planta. Otros clones fueron (9 y 16) (17,18,19), todas ellas lavanda, semejantes entre ellas, sin quimeras y con cualidades en la flor relevantes y agradables (figura 18). A pesar de ser clones, presentan todas ellas tonalidades que al mirar con detenimiento son diferentes, incluso en la forma y el abrir de la flor, lo que dice mucho de una posible variación somaclonal. La flor 15, se desarrolló poco y no abrió su corola.



Figura 18: Tratamiento .5M de EMS, variedad C43

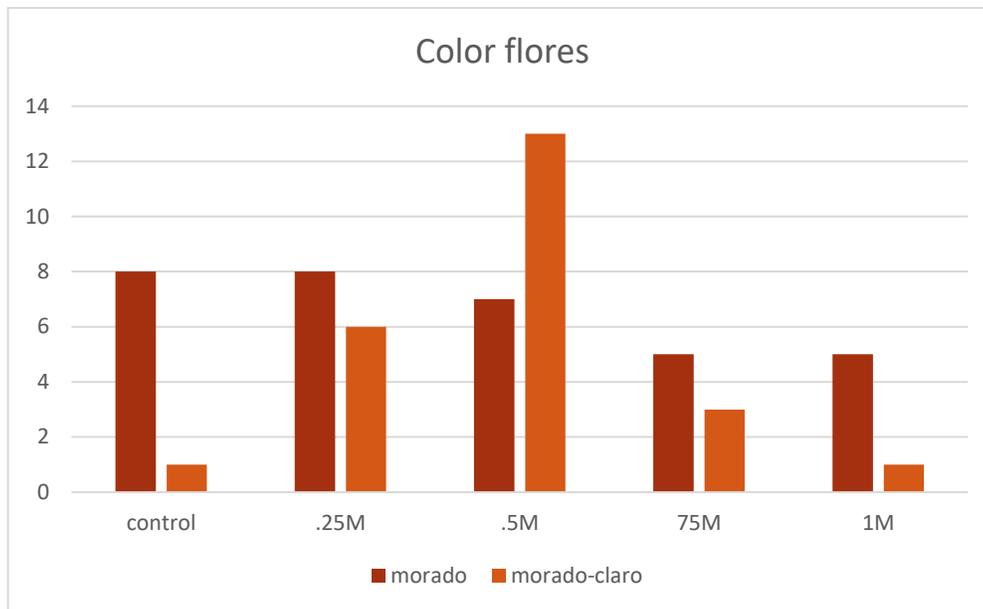


Gráfico 5: Colores en genotipo C43 y como cambio la proporción conforme de aumento la dosis de EMS.

En cuanto al color de las flores, la proporción cambio, pues en control hay 8P:1L, y con los tratamientos con EMS, la proporción de lavandas aumento en .25M, .5M Y 1M de EMS (grafico 5), ya tanto por la organogénesis que permitió los clones como por el hecho de que la mutagénesis pudo haber cambiado la dominancia del gen purpura sobre el gen lavanda que por ende pareciese ser recesivo, favorecido por la mutagénesis. Esto influyo en la obtención de más fenotipos lavanda, incluso una flor (13-figura 17) que llego casi a tonalidad de blanco, mostrando la efectividad del EMS al favorecer los cambios puntuales en el genoma.

Con todo el EMS muestra su capacidad de generar aberraciones fenotípicas, afectaciones en algún gen del desarrollo de la flor. Esto se ve claramente a partir de .5M de EMS, donde las flores 1,10 y 11 (figura 18), a pesar de ser clones, afecto seriamente su desarrollo, dejando flores mal formadas, con pétalos deformes y que mueren rápidamente, por lo general en menos de 3 días.

Además de la flor 5 (figura 18) en la cual el daño fue tal, que no hubo un desarrollo completo, la flor se pigmento por la mitad, los pétalos no se desarrollaron y el botón abrió y murió rápidamente.

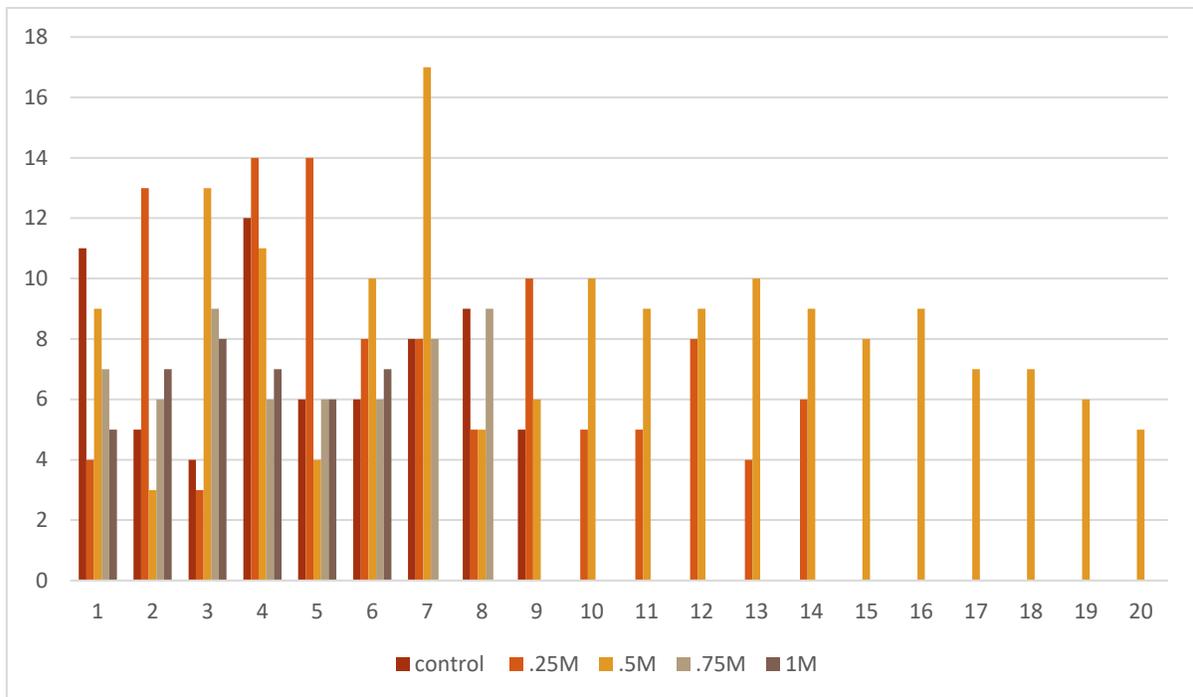


Gráfico 6: Muestra el número de flores totales obtenidas por tratamiento (EMS-Molaridad).

Dentro de las diferencias notables enmarcamos el número de flores obtenidas por planta y la diferencia aun es mayor por la aparición de plantas triples (grafico 6). En la base de la planta se generan desde la raíz principal, que dan origen a tres plantas que curiosamente van en descenso en altura total de planta, pero logran las tres dar flores muy semejantes y por ello tienen más flores que las demás. Entre ellas están .25M (2-5-9), .5M (3-4-7) y .75M (3) todos estos datos se pueden observar en el anexo1. Sin embargo, se puede observar que algunas otras como la planta 4 en .25M de EMS, tiene 14 flores y fue de las que más obtuvo, más que en control; y que en .5M de EMS, el promedio de flores es de 8-9 sin la quimera de formar tres plantas, facilitando la obtención de flores con un diámetro floral parecido y bastante homogéneas en su fenotipo.

Cabe señalar que ninguna de las plantas triples es clon, por lo tanto, cabe señalar que las triples son quimeras que necesitaban otro ciclo de inducción de brotes para eliminar las quimeras y facilitar una mejor introgresión de las mutaciones asimiladas.



Figura 19: Tratamiento .75M de EMS, variedad C43

Por último, tenemos los tratamientos más tóxicos, los que están por encima de la dosis letal media y tanto pueden ser tóxicos como lograr cambios increíbles. En tanto que las quimeras aquí se presentaron en la flor 3 de .75M (figura 19) la cual como otras de las plantas triples es una flor simple y mal desarrollada, llegando a intuirse que las plantas de flores simples fueron más susceptibles a formar brotes en su base para formar dichas plantas triples.

En .75M, está la flor con características más agradables (5-figura 19), de tono púrpura disminuyendo a azul, con poco número de flores, pero con una corolla semiabierta, pétalos desarrollados y juntos, en suma, la más agradable a la vista. Además, se obtuvo otros clones aquí (7-8, figura 19), lavanda, corolla abierta y de características agronómicas relevantes.

Ya en el último tratamiento de 1M de EMS, hubo muchas aberraciones en el desarrollo, fenotipos mal desarrollados con flores de pétalos muy ondulados como la 4 y 6 (figura 20) y otros de muy mal desarrollo, pigmentación de la mitad de la flor como la 1, o nulo desarrollo de la flor y muerte a los dos días de abrir el botón (2-3, figura 20).

La única que pareció ser indiferente y sin ningún perjuicio fue la flor 5 (figura 20), lavanda, de corolla abierta y pétalos bien desarrollados, flores, en suma, de agradables características.



Figura 20: Tratamiento 1M de EMS, variedad C43

Diámetro floral

Los diámetros de la flor, tomada con un vernier electrónico, son de importancia para corroborar la semejanza de las flores en la misma planta y descartar quimeras en la flor; y para comparar si hubo diferencias en el tamaño de la flor comparado al control y con ello una mejora en la calidad de la flor que pueda ser de interés.

En el gráfico 7 se muestra todos los promedios de los diámetros por tratamiento, se hizo una gráfica de medias para comparar entre tratamientos y se corroboró que en control y .75M, fue donde hubo un diámetro promedio más semejante, aun así, es en .5M el tratamiento donde se obtuvo la flor con el mayor diámetro (Anexo1). El promedio mostrado en la gráfica no aprecia las pantas de forma individual, donde .5M obtuvo las flores de mayor diámetro, pero también obtuvo flores con un valor cercano al cero, lo que deja la suma de sus promedios debajo de la media de .75M y control, ambos con más estabilidad en sus promedios y menos plantas.

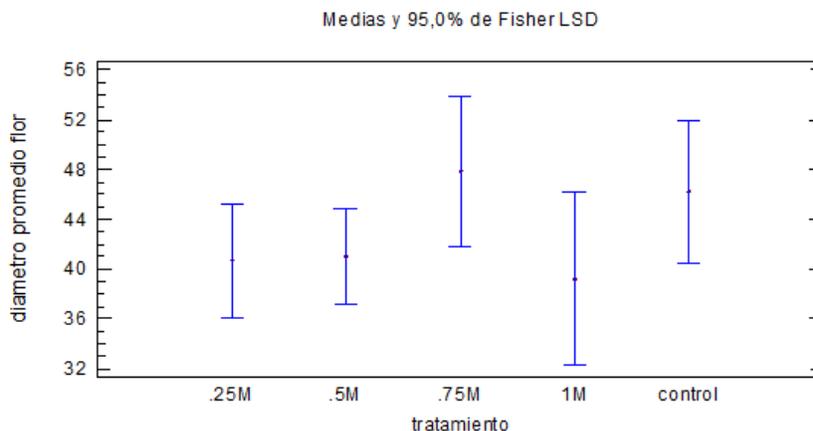


Gráfico 7: Suma de valores promedios de diámetros (intervalo de confianza del 95%)

En todos los tratamientos el promedio del diámetro floral fue parecido. Hubo excepciones donde el diámetro floral estuvo por debajo de los 10mm, esto debido a malformaciones o aberraciones provocadas por el EMS, lo que provocó un fenotipo poco útil.

Con ello la mayoría de los diámetros se mantuvo entre 36-56mm mostrada en el histograma (gráfica 8). Pocos rebasaron los 56mm, siendo la planta 9 de .5M(EMS) la de diámetro mayor (gráfica 9-anexo1).

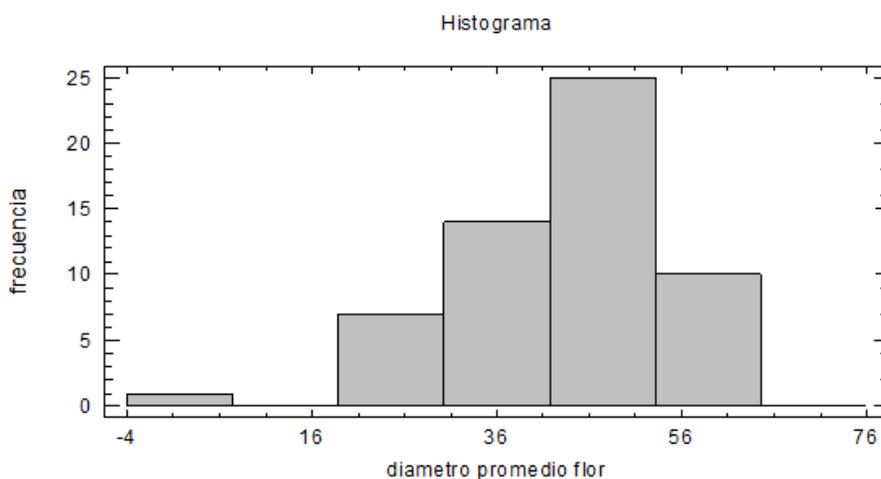


Gráfico 8: Muestra en histograma los promedios en flores más frecuentes, de entre 40cm y 55cm se encuentran la mayor parte de los tamaños de flor.

En las mediciones en el genotipo C43, los promedios de los diámetros fueron parejos para casi todos (gráfica 9), exceptuando algunas plantas que tuvieron flores quiméricas o con variación somaclonal, esto porque tuvieron diámetros muy diferentes, lo que aumenta la diferencia significativa entre las flores de una misma planta, esto supone que aumente de manera proporcional la desviación estándar.

Esto se muestra claramente en la gráfica 10, donde un ejemplo claro son las mutantes 7 de .25M y 2 de .5M, donde debido a una flor con corola cerrada y muy pequeña la diferencia significativa dio una desviación muy alta, esto puede ser debido a una quimera o incluso a una malformación del botón, sin embargo, esto denota de manera útil si el diámetro floral es estable y si la desviación estándar es por abajo de uno con un intervalo de confianza del 5%, nos da que el fenotipo es muy estable y sin quimeras, sin problemas genéticos y por ende útil para su uso pues sus flores son muy idénticas y eso ya marca un parámetro que gusta a los floricultores, por ello la preferencia por las semillas con seguridad y estabilidad genética.

Tanto en el control como en los tratamientos hubo flores pequeñas o mal desarrolladas en una misma planta donde hubo flores idénticas, esto puede ser por una malformación del botón o en casos que habrá que estudiar más su genoma, por alguna quimera, variación somaclonal o algún gen que fue mutado con resultados negativos. Hay que tomar en cuenta que el diámetro es en milímetros y que una diferencia de diámetros de 2 o 3 mm puede considerarse no significativa.

Los diámetros florales se dieron en 1M y en general en las flores simples y mal desarrolladas son mutaciones no deseadas y que en un siguiente paso en una generación M2 auto-polinizada podría no ser capaz de reproducir. En otras como 2-4-6-9 de .5M (gráfica 9) tenemos diámetros florales, los más altos de todos los fenotipos obtenidos, con la diferencia de que la flor 2 es simple purpura y las otras compuestas lavandas (figura 18), lo que nos deja una flor simple con características agradables, que paso el umbral de resistencia al EMS y que, con posteriores trabajos de mejora, ese diámetro y color podría ser favorable.

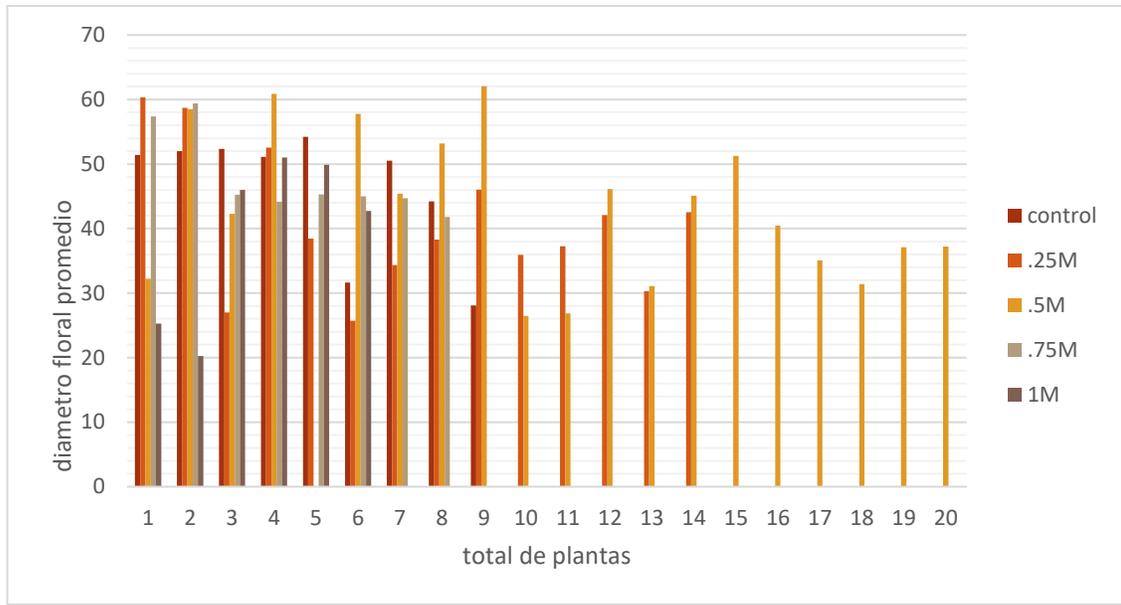
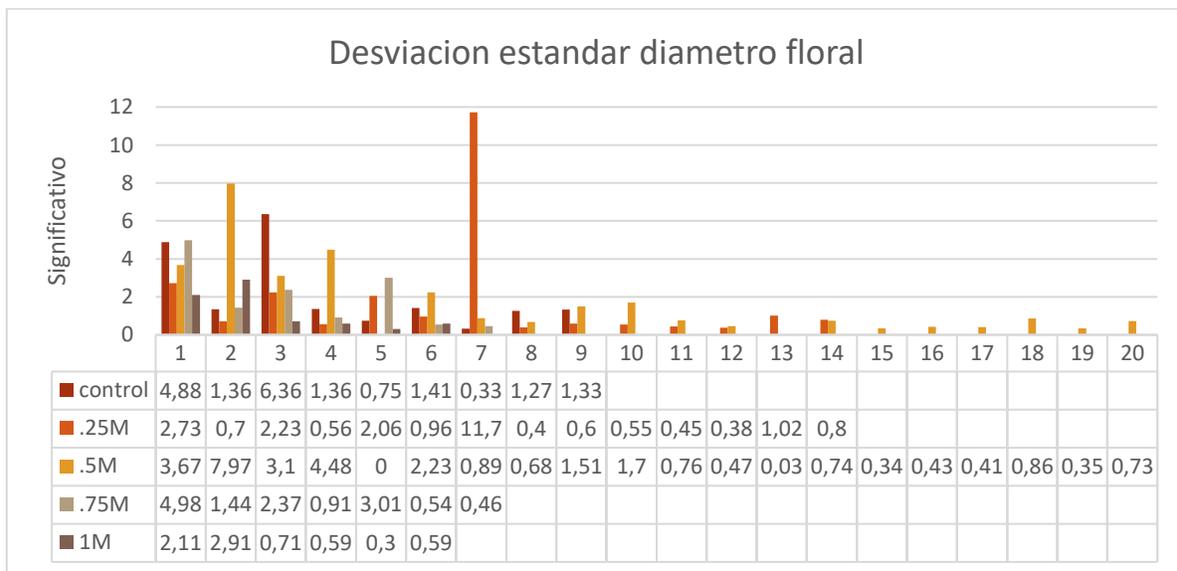


Gráfico 9: Los diámetros florales por tratamiento. Hasta .75M de EMS, todos tuvieron al menos una mutante que tuvo diámetros más grandes que los controles.



Grafica 10: Desviación estándar de promedios de diámetro de flor por tratamiento (EMS-Molaridad). Por debajo de “1” la desviación es poco significativa, por lo que las flores por planta son semejantes, sin quimeras, excepto en control 3, .5M- 2 y .25M-7.

Altura de plantas.

La altura de las plantas es otro factor agronómico de interés. Esto debido a que a mayor altura por lo general produce más botones (gráfica 11). Lo cual es ambivalente, puesto que mucha altura como el de la planta 1 del tratamiento .5M de EMS (gráfica 13), que fue la de mayor altura, no tiene el mayor número de flores, siendo en promedio de entre 65cm y 75cm donde más flores por planta se obtuvieron. La altura también puede ser desfavorable pues necesitas de una guía para que el tallo largo no rompa y provoque estrés y daño a la planta, pues con ello bajaría la calidad de la flor.

Así pues, la altura de promedio de plantas fue de entre 55cm y 70cm como se muestra en el histograma (gráfica 12). Con muy pocas plantas por debajo de los 50 cm y las cuales fueron las de menor número de flores.

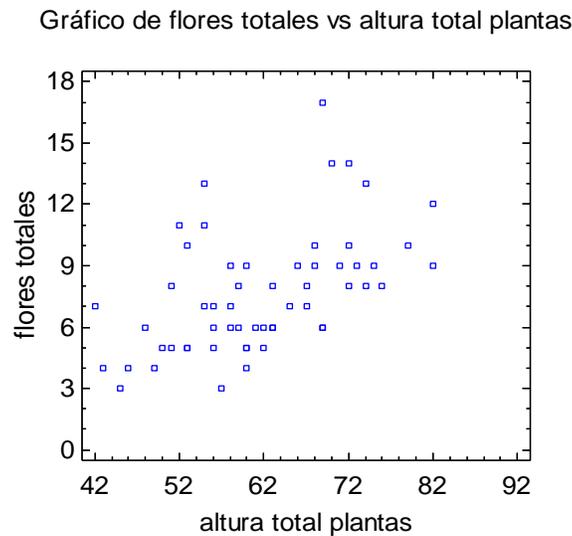


Gráfico 11: Gráfico de dispersión que compara si la altura favorece el número de flores, mas no es del todo verificable, puesto que el promedio de flores es estable (entre 5 y 8 botones) exceptuando mutantes con plantas dobles o triples o mutantes como la 4 (.25M) que fue la que más flores tuvo en una sola planta sin ser la más alta.

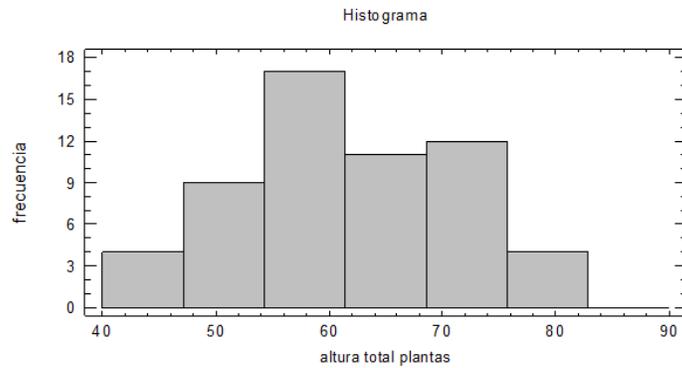


Gráfico 12: Muestra la frecuencia en la altura total de las plantas; entre 55cm y 70cm fue el promedio más alto, siendo además próximo a la media de la población.

En todas las mutantes hubo diferencias en varios factores debido a la toxicidad del EMS. Sin embargo, la estabilidad de las mutantes obtenidas en cuanto altura, mucho de lo cual puede ser por la organogénesis, es notable en tratamientos como 5.M de EMS, donde se puede apreciar que aunado a que fue en donde se obtuvieron mayor número de plantas, el promedio de altura es muy semejante y eso ayuda cuando lo que se busca en campo son cultivares con semejanza genética (grafica 13). Con ello, en control y .5M, fueron los dos factores donde hubo mayor altura.

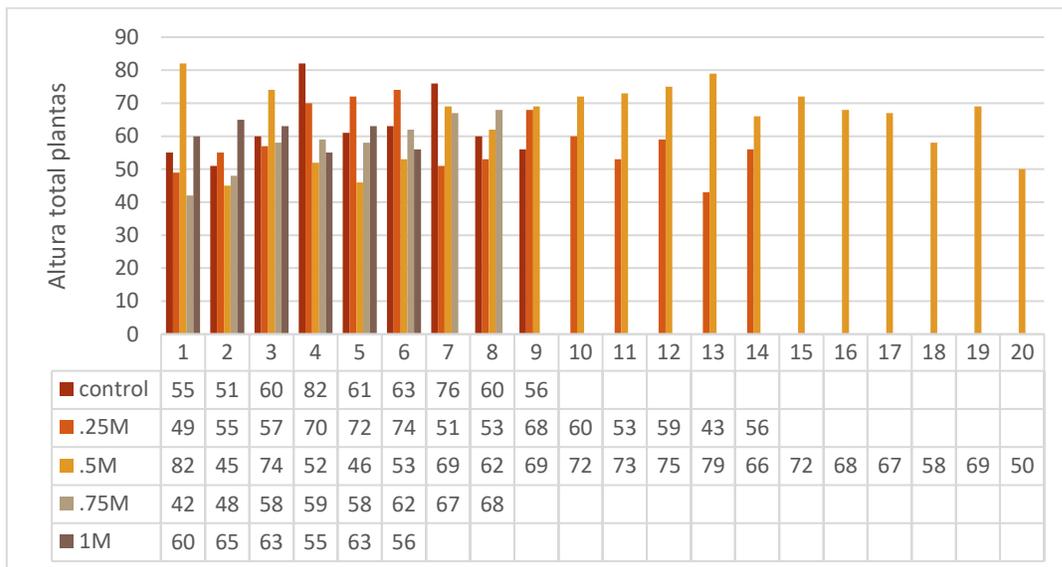


Gráfico 13: En el eje “y” altura en cm. En el eje “x” el número de plantas. Las mayores alturas se registraron en .5M de EMS. Y fueron semejantes en todas las mutantes.

Diámetro de tallo

El diámetro de tallo fue el último factor que se tomó en cuenta. Este factor es importante pues al igual que la altura lo es para poder generar más flores, el tallo es necesario para poder resistir el peso de las flores. Y aunque, las plantas necesiten guía para su desarrollo, un tallo de buen grosor y recto, sin dobleces o cambios de orientación en los nudos favorece una planta estable y con desarrollo capaz de soportar el peso de las flores.

El grosor de tallo menor a 2mm fue por lo general, en plantas con un desarrollo raquítico, como un tallo endeble, muchos dobleces a través de su trayecto y por consiguiente flores mal formadas y pocas. Entre menor es el grosor del tallo menor número de flores (grafica 15).

El promedio de tallos obtenido esta entre 3mm y 5mm, siendo muy favorable para el desarrollo de la planta y el número de flores (grafica 14).

El valor positivo es que, en todos los tratamientos se obtuvo un mayor diámetro de tallo que en control, lo que favorecerían en los tratamientos con EMS para el engrosamiento del tallo y un mejor desarrollo de la planta. Es en los tratamientos .25M y .5 M de EMS son donde se observa un mayor diámetro en el grosor del tallo, también una estabilidad en su promedio en todas las plantas. Aunque curiosamente en 1M de EMS es donde se obtuvo mayores grosores de diámetros, siendo que en estos tratamientos las flores no fueron de características deseables y 5 de ellas son aberraciones notables (grafica 16).

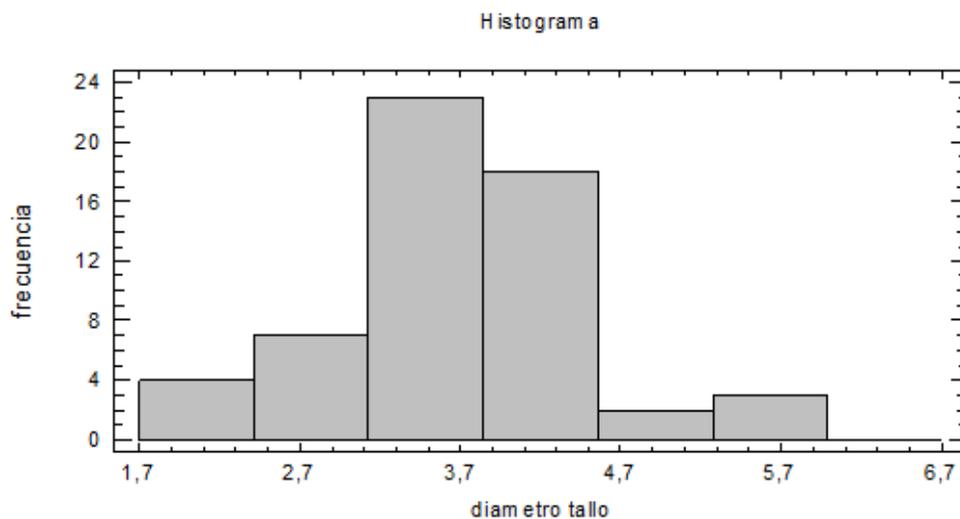
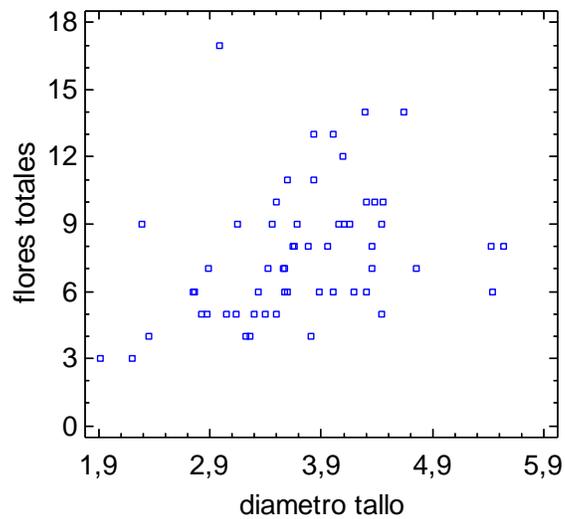


Gráfico 14: Muestra la media promedio de diámetros de tallo y su frecuencia.

Gráfico de flores totales vs diametro tallo



Grafica 15: Dispersión comparativa entre el diámetro de tallo y número total de flores.

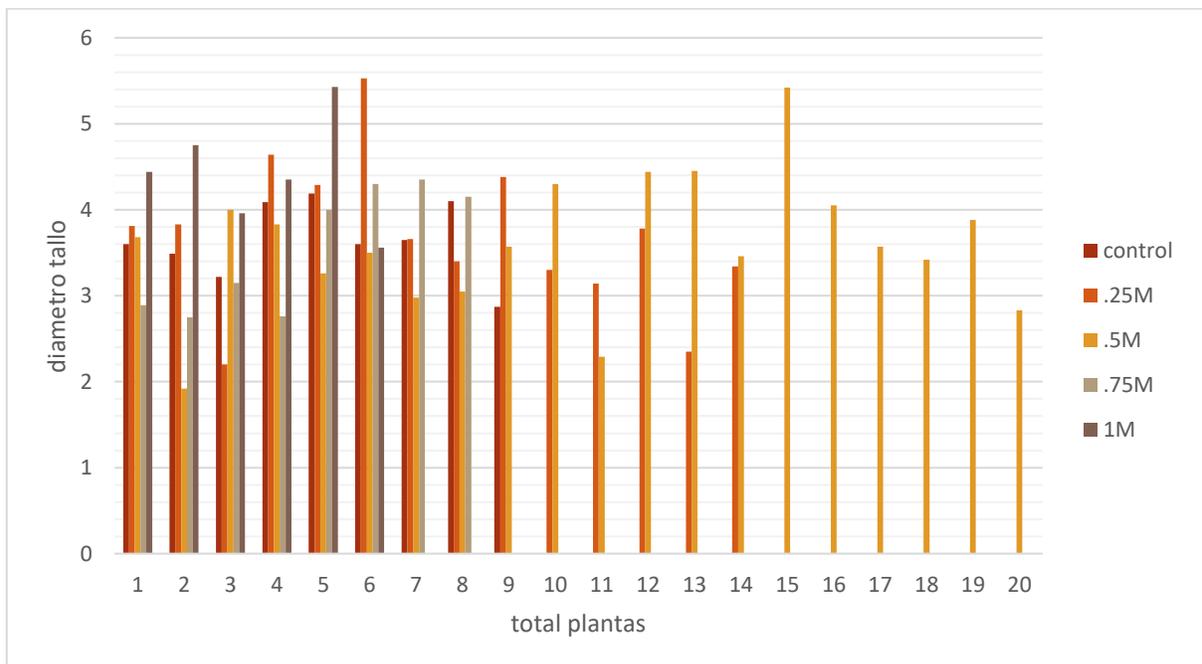


Gráfico 16: El diámetro de tallo en milímetros contraparte con cada planta obtenida por tratamiento con EMS (Molaridad). Las mutantes con el mayor grosor de tallo fueron .25M, .5M y 1M.

Variedad C83

Como complemento a las mutantes C43, está la cepa C83; únicas de las que se obtuvieron mutantes. Y aunque la población era mínima para hacer estadística y valorar un cambio significativo matemático, de manera visible hay varios factores que mejoraron en la mutante a diferencia del control (tabla 11).

Tabla 11: El genotipo C83 y las pocas mutantes obtenidas; nótese que la mutante .5M es morada, rompiendo el esquema de color rosa de la variedad.

Tratamiento	Planta	Características de la flor			Características vegetativas			
		Tipo	Color	Diámetro promedio (mm)	# flores	Diámetro Tallo (mm)	#hojas	Altura total
Control	1	Simple	Rosa	31.14	1	2.93	16	38
	2	Simple	Rosa	33.2	1	3.14	18	43
	3	Simple	Rosa	35.5	2	2.68	16	35
.25M	1	Compuesta	Rosa	45.385	9	5.83	24	53.5
	2	Compuesta	Rosa	42.23	6	4.54	28	38.9
.5M	1	Compuesta	Morada	43.08	13	5.2	32	78.5

El primero y más importante: el fenotipo de la flor, es decir, las flores del control son de plantas que se obtuvieron de una cruce de parentales y una autopolinización de la F1, esto nos da dos pautas del mejorador: quería plantas homocigotas y que conservaran genes recesivos ya sea de color o forma. Esto nos da por consiguiente que ya la progenie que tiene la cepa sea una flor pequeña y con las características menos deseables, de planta enclenque y raquílica, pocas hojas, enana y bueno, la flor, de características agronómicas no deseables, mal desarrollada, aberrante, esto sin el uso de EMS, nótese ese importante detalle, no hay ningún tipo de error o mal formación por el estrés o la mutagenicidad del químico (figura 21).

En cambio, en .25M de EMS, las flores cambiaron totalmente. Además de haber mayor número de flores, son de pétalos bien desarrollados, color uniforme y corola abierta, la flor es visiblemente más agradable y de características agronómicas deseables (figura 21).

He aquí lo más interesante de este genotipo: las mutantes fueron de entrada con una altura total más estable, pero lo que mejoró su fenotipo fue el tallo grueso y recto que le confiere un fenotipo de características agronómicas deseables, y además le da resistencia y mejora pues aumenta por mucho la cantidad y calidad de las flores (tabla 11). Esto sumado a nuestro cierre pomposo, donde siendo una cepa de color rosa, en .5M cambia su color de manera drástica a morado, y no solo eso: el tamaño del diámetro floral y la altura total de planta es de los de más alto de todos los genotipos de los que se obtuvieron mutantes (figura 21).

Las flores obtenidas de las mutantes en .25M son flores simples, de una sola línea o verticilos de pétalos; son de diámetro promedio un poco mayor al control, pero a diferencia de este, las mutantes se desarrollaron bien y sus pétalos son tersos y sin imperfecciones. Los controles tuvieron una flor desagradable a la vista, pues se desarrolló de manera incompleta y sus pétalos son rugosos y parecen marchitos o quemados. (tabla 11)



Figura 21: Flores C83.

Errores mutagénicos



Figura 22: Imagen superior: Izq. (control C40) Der. (control C74). C40 .25M de EMS (inferior central).

En cuanto a los genotipos C74 Y C40; ambos fueron en control, negativos. Esto puede ser porque la variedad necesita otras temperaturas, puesto que se ha visto que en otros genotipos de lisianthus, cuando no hay una baja temperatura la planta queda en roseta y no se desarrolla, es solo una fase en que se queda atrapada si ningún cambio (figura 22).

Ambos controles permanecieron inmutables y no generaron ningún punto de comparación para las mutantes; más las mutantes tuvieron en algunos casos como en C40, un desarrollo, incluso de llegar a nivel de flor, donde aparecieron los botones que parecían fueran a tener flor, más fue infructífero, pues murieron antes siquiera de abrir; algunas incluso abrieron, pero no hubo desarrollo y la aberración y daño por el EMS fue tanto que murieron ya con el botón desarrollado (figura 23).

Otras tuvieron otro tipo de aberraciones como hojas en nudos de crecimiento errante y pequeñas, con todo y que el tallo y las hojas se desarrollaron con color y apariencia sana, no llegaron a la flor y produjeron en los nudos estas hojas de crecimiento errático. Además de algunas plantas que solo murieron en cuanto parecía que empezaban a crecer (figura 24). Algunas desarrollaron el tallo con un color parecido a la clorosis, y quedaron sin llegar a la fase de generar siquiera botones, en forma vegetativa, raquílicas y mueren rápido (figura 22).



Figura 23: Variedad C40, imagen izquierda (.5M EMS), imagen derecha (.25M EMS).



Figura 24: Aberración en hojas, crecen de manera desordenada. Variedad C40 (.5M de EMS)

El genotipo C74 no fue muy diferente, el control como antes se mencionó solo quedó como roseta sin desarrollo y al menos sin cambios aparentes. Mas las mutantes tuvieron algunas un desarrollo, que pareciese que empezaban a crecer, pero se quedó en eso, sin más se detuvo su crecimiento y murieron rápidamente. Muchas de ellas no desarrollaron tallo ni un crecimiento apical, tan solo se crecieron un poco después del paso de la charola a la tierra y se mantuvieron así durante meses (figura 25).

Esta variedad tanto en control como en las mutantes quedó sin ninguna variación, aunque a nivel de roseta se ve un crecimiento desordenado y amontonado de hojas, quizás producto de una posible aberración que las afectó.



Figura 25: Variedad C74; control, .25M, .5M de EMS.

El genotipo C83 fue el que tuvo ventajas, crecieron unas pocas y dieron flor, dejando un positivo aspecto sobre el uso del EMS, mas solo fueron unas pocas, pues al igual que los otros genotipos, en control hubo las que se quedaron en roseta, y en mutantes también. Más de la tercera parte de las mutantes no se desarrollaron y además varias de ellas, tuvieron mutaciones aberrantes a nivel de roseta; hojas mal formadas, más delgadas y de un color amarillentos, arrugadas y en conclusión nada parecidas a las hojas típicas del lisianthus, dejando claro en que esas mutantes, pese a haber sobrevivido todas las etapas hasta invernadero, se colaron fallas mutagénicas que no fueron infranqueables y que dejan claro que el juego mutagénico es azaroso para obtener tanto beneficios como perjuicios a la mutante (figura 26).



Figura 26: Variedad C83: .5M, .75M Y 1M de EMS.

Conclusiones

En trabajos como los de Latado & Neto, 2004; la dosis letal media es parecida mas el tiempo de exposicion es por mucho mas alta que el usado en nuestro trabajo. Por ello la dosis letal fue en 1M de EMS por 1h, donde hubo muy poca sobrevivencia y ademas muchas aberraciones que llegaron a presentarse hasta nivel de flor donde corroboramos las mutaciones desfavorables. En dos horas de exposicion, incluso en las dosis mas bajas fue fatal, la muerte de todas las semillas fue inexorable.

Los datos antes presentados nos dan dos pautas: 0.25M y 0.5M de EMS, son los tratamientos más estables, pues mantiene una variabilidad baja, y algunos de ellos favorecieron flores más grandes, sin embargo, .75M, también tuvo mutantes con diámetros florales más grandes que el control y con diferencias significativas mínimas, dejando claro que en los tres primeros tratamientos se obtuvieron mutantes con características favorables en cuanto al tamaño de la flor.

Otro factor fue la proporción fenotípica, pues en el control se obtuvieron 3 veces más plantas purpuras que lavanda, esto cambio con las mutantes que casi emparejo el número de plantas con colores lavanda o más claros, llegando en una mutante a una tonalidad cercana al blanco. También hubo un cambio en el tipo de flor, pues, aunque en el control ya había una proporción doble en cuanto a las compuestas de las simples; en las mutantes se triplico esta proporción al ser un mayor número de flores compuestas, es decir, de verticilos espiralados. Esto favorece la una flor más voluminosa y con varias capas de pétalos, dando más valor a la estética de la flor.

En cuanto a las características vegetativas; la altura y el grosor influyen en dos aspectos importantes: entre más altura tenga la planta más posibilidad de generar ramificaciones y por ende mayor número de botones. Esto no tuvo diferencia significativa en los valores obtenidos en estos experimentos, puesto que faltarían datos para que fuera significativo, más si demostró que a más altura tuvo un número más estable de botones y, por el contrario, se vio que una planta pequeña y raquítica tiene menos flores y es visiblemente más susceptible debido al otro factor importante: grosor de tallo.

El grosor de tallo nos deja claro dos aspectos, toma la planta una visible característica fenotípica de resistencia y belleza, y le confiere fuerza para soportar las pesadas flores y más si son múltiples.

Esto facilita el trabajo del floricultor pues si los tallos son delgados tienen a doblarse o quebrarse, ya sea por el peso o por factores como lluvia o viento si están a la intemperie o por manejo de la planta. De cualquier modo, la planta necesita de soportes o guías para su desarrollo, pero ello mejora si los tallos son gruesos y la planta de una altura promedio de entre 50cm y 70cm totales.

Para aglomerar las posibilidades totales; una planta con las características adecuadas y llamativas para el floricultor y el consumidor final, deben tener: Un alto de planta promedio, un grosor capaz de sostener el peso y un número de botones alto para que la producción merezca.

En conclusión, el uso de EMS, no fue crítico para la obtención de variedades en el genotipo C43, mas es visible que amplía la variabilidad genética y en cierto modo con un poco de sucesivas polinizaciones, podrías obtener una planta viable, aun así, en trabajos con EMS es necesario un número alto de población inicial, ya sean semillas o explantes, para trabajar.

En cuanto a el genotipo C83, como se dijo antes, que al ser una autopolinización en una F1, de la cual no se conocía su fenotipo, pero se busca una homocigosis para favorecer la expresión de ciertos genes, el fenotipo no fue el de características agronómicas más útiles. Esto tiene en ocasiones la desventaja de que puede darnos genes recesivos desfavorables, que en heterocigosis no se presentaría; se pueden obtener con una alta tasa de polinización una posibilidad de obtener los genes deseados, pero al jugar con la autogamia artificial nos puede dar un cuello de botella y la expresión de genes no deseados o plantas estériles o aberraciones.

Al final fue la elección del genotipo la principal diferencia y donde podríamos atisbar un mejor método para el futuro: Los genotipos con baja variabilidad genética son una buena opción para experimentar, los que tienen ya una variabilidad genética como la cepa C43, solo obtendremos como se vio en las fotos, diferencias sutiles en los tamaños de la morfología floral y vegetal, además del color de las flores; a veces se podrán obtener buenos resultados, pero otras podrían ser algo insignificante. Además, en C43 los controles también tenían flores con características

positivas, y que no cambio mucho salvo los colores en los cuales se necesita el ojo imparcial de la cámara para apreciarlos y, aun así, habrá que hacer un test para corroborar que es azul o blanco como parecen ser. Estas dos mutantes que parecen ser en cuanto a color las más llamativas, son la mutantes del genotipo C43 13 (.25M - azul) y la mutante 2 (.5M - blanca).

También pudimos ver que pese a que la dosis letal media es de .5M, donde se obtuvo en la mutante 5 (.5M) una aberración que condujo a flores mal desarrolladas; que la concentración hasta .75M podría ser al límite donde podríamos experimentar para futuros protocolos parecidos a este, pues, aunque que hubo un menor número de sobrevivientes, las que lo lograron fueron plantas de características estables, sin aberraciones o rastro de que algún gen importante haya sido afectado. Por ello, haciendo uso de la dosis letal media aquí obtenida, las concentraciones donde podríamos obtener mejores resultados a la vez que nos jugamos la toxicidad del EMS, es de entre .5M y .75M, donde habrá una alta tasa de mutación y con las técnicas de cultivo *in-vitro* podríamos obtener variedades relevantes.

La variedad C83 en cambio, tuvo cambios positivos en la flor y en la planta, dejando claro que, si se trabaja con una variedad homocigótica o con genes recesivos, la capacidad del EMS como agente para aumentar la variabilidad genética y por consiguiente mejorar los posibles efectos de la autogamia, fueron positivos y se valora su uso en protocolos posteriores.

Tanto en el grosor del tallo, como en la altura de la planta, que aunados mejoran la cantidad de flores cambio con respecto al control. Además, la calidad de la flor es notablemente mejor que en control, y en el tratamiento .5M de EMS es fascinante el cambio de color de rosa a morado. Dejando la incógnita de si los genes de color rosa y morado están en la misma vía genética con solo unos cuantos factores para que se exprese uno u otro.

En el anexo 1 se muestra todas las características tomas para la variedad C43.

En el anexo 2 se encuentran las características tomadas para la variedad C83

La clave: la selección de las mutantes que pudieran ser de provecho y el uso de diferentes técnicas para su conservación; ya sea obtención de semillas, guardar el germoplasma,

reproducción vegetativa o técnicas in-vitro para la organogénesis o embriogénesis. La selección de genotipos elite, con homocigosis o una alta autogamia, con lo que el uso del EMS realmente favorezca la expansión de ese cuello de botella, la amplitud en el genoma y que la variabilidad genética pueda darnos mutantes que sean útiles agronómicamente y con ello favorecer la liberación de plantas ornamentales con características que gusten al consumidor y mejoren la calidad de las flores en el mercado.

Complementario a esto, es necesario una población M2 (Sikora *et al.*, 2011), o una segunda organogénesis, esto para favorecer la desaparición de quimeras por completo y asegurar la introgresión genética. Una vez identificadas las variedades que son de interés y que la mutagénesis favoreció, se debe o auto-polinizar para generar semillas homocigóticas o guardar ya sea germoplasma o seguir con la organogénesis, esto para no perder el genotipo obtenido y poder seguir trabajándolo o que sea de utilidad para la comercialización.

Discusión

Poniendo en perspectiva otros estudios como los de Ahloowalia.B.S, (1998) o Jong & Siguina, (2011), la dosis letal media esta entre .2% y 1% que en terminos de concentracion molar seria entre .1M y 1M. Espectro amplio cuando se trata de concentraciones, sin embargo, en nuestro trabajo corroboramos con curvas de muerte casi paralelas al eje de la recta, que la dosis letal media es de .5M y que a cada concetracion la toxicidad aumenta de manera directamente proporcional.

Ademas las quimeras que se pudieron evitar por el cultivo *in-vitro* no fueron lo suficientemente efectivas, pues Ahlowalia & Maluszynski, (2001) recomiendan un sucesivo cultivo para la eliminacion de las mismas. Estas organogenesis deben ser repetidas un minimo de 3 veces para eliminar la mayor parte de las quimeras, sin embargo, en nuestro trabajo solo se trabajo con la induccion de brotes en un solo ciclo, por lo que se corrobora que al final hubo muchas quimeras, erores mutagenicos que lograron la adaptacion y llegaron incluso en algunos casos hasta la madurez de las plantas aunque sin resulatdos satisfactorios.

La finalidad de nuestro trabajo se alcanzo al obtener nuevas variedades sobre las cuales trabajar y que daran ayuda a productores de flores mexicanos, sobre todo para impulsar en el mercado floral a lisianthus como una flor de alto valor estetico y economico.

Lisianthus es una flor endemica de nuestra region y por ello es importante su apertura y reconocimiento para que su valor aumente y sea apreciada. Todas estas variedades que se obtuvieron despues de la mutagenesis han comprobado ser capaces de adaptarse al clima del occidente y centro de nuestro pais y tener la estetica para llamar la atencion de consumidores y productores.

Es notable como las nuevas tecnicas de cultivo *in-vitro* aunadas a la mutagenesis mas convencional, resulta en un metodo practico, medianamente barato y rapido para su uso en protocolos de mejoramiento genetico, porque nada como lo mas burdo y drastico para inducir variabilidad genetica en la biologia de los organismos.

Bibliografía

- A., A. (5 de Mayo de 2016). *Flores, negocio rentable para Mexico sobre todo por contexto del dolar y petroleo*. Obtenido de www.UDG.mx/es/noticia/flores: www.UDG.mx
- A.J. Slade, S., Fuersten, D., Loeffler, M., Steine, & Facciotti, D. (2005). a reverse genetic nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology*, vol.23, No. 1, PP 75-81.
- Ahloowalia, B. (1976). Chromosomal changes in parasexually produced Ryegrass. *In current Chromosome research*, 115-122.
- Ahloowalia, B. (1983). Spectrum of variation in somaclones of triploid Ryegrass. *Crop Sci*, 1141-1147.
- Ahloowalia, B. (1992). In-vitro mutation and multiplication of Chrysanthemum cultivars. *farm food*, 2:28-29.
- Ahloowalia, B.S. (1998). in-vitro techniques and mutagenesis for the improvement of vegetative propagated plants. *Kluwer academic publishers*, 293-309.
- Ahlowalia, B., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica - Kluwer Academic publishers*, 167-173.
- Amanda S. Berenschot, M. I.-N. (2008). Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. *BRAZILIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY*.
- Arena, V. (2002). Ionizing radiation and life. *St. Louis Mosby*, 453.
- Auerbach, C. (1949). Chemical mutagenesis. *Biological reviews of the cambridge philosophical society*, 355-391.
- Auerbach, C., & Robson, J. (1946). Chemical production of mutations. *Nature*, 302, vol.157.
- B.J. Till, S., Reynolds, C., & al., W. e. (2004). Discovery of induced mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology*, vol 4, article 12.
- B.J. Till, S., Reynolds, E., & Greene. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research*, vol 13, No. 3, pp 524-530.

- Ba, S., & S., K. (1999). *Breeding in Crop Plants: Mutations and in Vitro Mutation Breeding*. Kalyani Publishers, Ludhiana.
- Barbaro, L., Karlanian, M., & Morisigue., D. (2009). The floating system as an alternative for the production of Lisianthus seedlings(*Eustoma Grandiflorum* L.) . *Agriscientia*, 26: 63-69.
- Bautista, R. O. (2006). Floricultura Mexicana . *Revista Claridades Agropecuarias*, 3-43.
- Broertjes, C. (1977). Mutagen treatment and handling of treated material. *Manual of mutant breeding - International atomic energy agency - Vienna* , 160-168.
- Camargo, M. S., Shimizu, L. K., Saito, M. A., Kameoka, C. H., C.Mello, S. d., & Carmello, Q. A. (2004). Crescimento e absorção de nutrientes pelo Lisianthus (*Eustomagrandiflorum*) cultivado em solo. *Horticultura brasileira, Brazilia*, 143-146.
- Carmello, Q. (2004). Crescimento e absorção de nutrientes pelo Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivado em solo. *Horticultura Brasileira*, 143-146.
- Casarett, A. (1978). *Radiation Biology*. Prentice Hall, New Jersey, 367-370.
- Cassells, P., Walsh, C., & Periapuram, C. (1993). diplontic selection as positive factor in determining the fitness of mutants of *Dianthus "mystere"* derived from X-radiation of nodes in-vitro culture. *Euphytica*, 70: 167-174.
- Cecon, P., & M.S., B. (2006). Produção de lisianthus cultivado em vasos com diferentes soluções nutritivas e formas de condução. *Horticultura brasileira*, 6-10.
- Colbert, T., Till, B., & Tompa, R. (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology*, No: 2. 126:480-484.
- Corr, B., & Katz, P. (1997). A grower's guide to lisianthus production. *Floracultura International*, 16-20.
- Dahab, A. A., Heikal, A. A., Taha, L. S., & Gabr, A. M. (2017). In vitro Mutagenesis Induction in *Eustoma grandiflorum* Plant using Gamma Radiation. *Journal of Environmental Science and Technology*.

De Jong, J., & Custers, J. (1986). Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and in vitro culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica*, 137-148.

Dominguez, A. (2002). CULTIVO DEL LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*). . *maestria en ciencias de la horticultura*, simposio 2002, Coahuila, saltillo.

Dominguez, R. (2008). Lisianthus: una especie con alto potencial. *Consejo Mexicano de la flor ornamentales*, 24-25.

FAO-IAEA. (2011). *Mutant variety database*. Obtenido de <http://mugs.iaea.org/aboutMutantVarieties.aspx>.

Floricultura mexicana; Flores de corte. (2006). *Revista Claridades Agropecuarias*, 60.

Fox, R. (1998). Lisianthus-a specialty cut flower. *Practical Hydroponics & Greenhouse*, 43-51.

Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R., & Gelbart, W. (1996). *An introduction to genetic analysis (6ed)* W.H. Freeman & Company. New York: McGraw Hill (Madrid).

H., B. (1995). Radiation induced mutations for plant selection . *Applied radiation and isotopes*, 46:589-594.

H., J. H., & W., H. (1980). Variation following mutagenic treatment of cuttings and in vitro cultures of Chrysanthemum (in German). *Z. Pflanzenzüchtg*, 189-199.

Harbough, B. (2006). Lisianthus, *Eustoma Grandiflorum*. in Anderson NO(ed). *Flower breeding and genetics*, springer. *Netherlands*, 645-663.

Harten, B. &. (1978). Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops. *Elsevier, Amsterdam*, 5-17.

Hernandez, C. H. (2011). Respuesta de lisianthus(*Eustoma Grandiflorum* Raf.) CV. Echoe Blue a diferentes dosis de nitrógeno, calcio y magnesio.

INEGI. (enero de 2018). *INEGI*. Obtenido de territorio/extension: www.inegi.org.mx

J.A. perry, T., & L Wang, T. (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus* . *Plant Physiology* , vol 3, pp. 866-871.

- Jain, S., & Häggman, H. (2007). Protocols for micropropagation of wood trees and fruits. *Springer*, 323-333.
- Jimenez, J. G. (2004). La tecnología nuclear en el mejoramiento de plantas. *Ciencia*, 43-51.
- Jong, X.-F., & Siguina, T. (2011). in-vitro mutagenesis of Saint Paulia using ethyl methane sulfonate. *HortScience*, 981-984.
- k., N., M., K., N., S., & T., T. (2005). Transmissible and non-transmissible mutations induced by irradiating Arabidopsis thaliana pollen with g-rays and carbon ions. *Genetics*, 881-889.
- Khalatkar, A. S. (1976). Influence of DMSO on mutagenicity of EMS in barley. *Bot. Gaz. The University of Chicago*, 348-350.
- Kumar Senapati, S., & Ranjan Rout, G. (2008). in-vitro mutagenesis of rose with ethylmethanesulfonate(EMS) and early selection using RAPD markers. *Advances in horticultural Science*, Vol 22 No3:218-222.
- Maluszynski, M., Sigurbjornsson, B., Amano, E., Sitch, L., & Kamra, O. (1992). Mutant varieties-data bank, FAO/IAEA database. *Mutant varieties news*, 39:14-17.
- Mazuela, P., de la Riva, F., & Urrestarazu, M. (2007). Cultivo de lisianthus en perlita. *planta flor*, 92-94.
- McCallum, C. N., Shaw, P., Muehlbauer, G., Marshall, D., & Waugh, R. (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hodeum vulgare* L.). *Plant journal*, vol 40, No. 1, pp. 143-15.
- Melgares de Aguilar, C. (1996). El cultivo de lisianthus. *horticultura*, 13-16.
- Morales de la Riva, P. (2013). Comportamiento productivo del Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn) en cultivo sin suelo. *Revista Chapingo*, ser.hortc vol.19 no.2.
- Muller, H. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*, 84-87.
- Novak, F. (1991). Plant Tissue cultura tecnicques for mutation breeding. *A training manual, Austria*, 194 pags.

Olvera. (2004). Evaluacion tecnica financiera de lisianthus(*Eustoma grandiflorum* Shinn.) para flor de corte bajo invernadero.

P., D., & Sonnino. (1998). Induced mutations in plant breeding: current status and future outlook in somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. *Kluwer academic publishers*, 255-291.

Per Sikora, A. (2011). Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional Genomics, and Breeding. *International Journal of plant Genomics*.

Per Sikora, A. C. (2011). Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional Genomics, and Breeding. *International Journal of Plant Genomics*.

Perez, S., & Ivan, U. (2013). INDUCCIÓN DE MUTACIONES FOLIARES EN LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) UTILIZANDO AGENTES MUTAGÉNICOS FÍSICOS Y QUÍMICOS. Estado de Mexico: INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS.

Pratibha misra, S. K. (2007). standardization of in vitro protocol in *Chrysanthemum* cv. madame E. Roger for development of quality planting material and to induce genetic variability using gamma radiation . *indian journal of biotechnology*, 121-124.

Predieri, S., & Zimmerman, H. (2001). Pear mutagenesis: in vitro treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica*, 117:217-227.

R.R., L., Neto, T., & B.M.J., M. (1996). In vitro mutation breeding of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandifolia* Tzvelev.) cv. Pink repin (in Portuguese). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 489 - 496.

Ramírez, A. D. (2002). CULTIVO DEL LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*). cohahuila.

Rodrigo Rocha Latado, A. H. (2004). In vitro mutation of *chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103-106.

Roh, M., & Lawson, R. (1984). the lure of lisianthus. *greenhouse Mgr*, 2:103-104, 108-110, 112-114, 116-121.

- Sabetta, W., Blanco, V. A., & Montemurro, C. (2011). SunTILL: A TILLING resource for gene function analysis in sunflower. *Plant Methods*, vol. 7, No. 1, pp. 20.
- Santana I, O. N. (1996). Utilización del α - bromonaftaleno en la inducción de mutaciones en cultivo de tejidos de caña de azúcar. *boyerps*, 3-14.
- Secretaria de agricultura, g. d. (2012). *Comunicacion Social, boletin 012*. Dsitrito Federal: SAGARPA.
- Sega, A. G. (1984). A review of the genetic effects of Ethyl Methane Sulfonate . *Elsevier Science Publishers, Mutation Research*, 134:142.
- Shibata, M. (2008). Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding . *Plant biotechnology, Review*, 25:3-8.
- Shinnner, L. (1957). Synopsis of the genus Eustoma. *The southwestern naturalist*, 2:38-43.
- Signor, C. L., Savoie, V., & Aubert, G. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in medicago truncatula. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 7, No. 5, pp. 430-441.
- Stadler, L. (1928). Genetic effects of X-Rays in Maize. *Proceedings of national academy of science of de United States of America*, 69-75.
- Stadler, L. (1928). Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*, 186- 187.
- Swaminatan. (1995). The detection of induced mutations. In: FAO/IAEA division of atomic energy in food and agriculture (ed), *Manual on Mutation Breeding. International Atomic Energy Agency, Vienna*, 138-141.
- Till, B., Cooper, T., & al, T. e. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology*, vol.7, article 19.
- Torres, K. (1998). Tissue culture techniques for horticultural crops. *Avibooks, New York*, 1-26.
- Triques, K., Sturbois, B., & Gallais, S. (2007). Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant Journal* , vol.51, No.6, pp.1116-1125.

- Van Harten, A. (1998). *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press, London.
- Wang, L., Zhang, B., Li, J., Yang, X., & Ren, Z. (2014). Ethyl methanesulfonate(EMS) - Mediated mutagenesis of Cucumber (*Cucumis Sativus* L.). *Agricultural Science*, 5: 716.721.
- Wood, D., & Weaver, R. (1982). The genera of gentianaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 63:441-487.
- Yin Lu, S. D. (2016). Microspore Induced Doubled Haploids Production from Ethyl Methanesulfonate (EMS) Soaked Flower Buds Is an Efficient Strategy for Mutagenesis in Chinese Cabbage. *frontiers in plant science*.
- Yu-Shi Luan, J. Z.-R. (2007). Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 77-81.

Anexo1

Tratamiento	Morfología floral				Morfología vegetal		
	tipo	color	diametro promedio/ Desv est(mm)	# botones	diam tallo	tallo (cm)	altura total de plantas (cm)
control	1	1	51,4125	11	3,6	4,879	55
control	2	2	52,02	5	3,49	1,356	51
control	3	1	52,37	4	3,22	6,36	60
control	4	1	51,135	12	4,09	1,363	82
control	5	1	54,23	6	4,19	0,753	61
control	6	1	31,62	6	3,6	1,41	63
control	7	1	50,54	8	3,65	0,329	76
control	8	1	44,22	9	4,1	1,272	60
control	9	1	28,08	5	2,87	1,325	56
.25M	1	1	60,33	4	3,81	2,725	49
.25M	2	1	58,69	13	3,83	0,704	55
.25M	3	1	27,01	3	2,2	2,23	57
.25M	4	2	52,56	14	4,64	0,5581	70
.25M	5	1	38,46	14	4,29	2,056	72
.25M	6	1	25,74	8	5,53	0,957	74
.25M	7	1	34,37	8	3,66	11,719	51
.25M	8	1	38,32	5	3,4	0,401	53
.25M	9	2	46,02	10	4,38	0,601	68
.25M	10	2	35,94	5	3,3	0,546	60
.25M	11	2	37,28	5	3,14	0,447	53
.25M	12	2	42,08	8	3,78	0,379	59
.25M	13	2	30,32	4	2,35	1,016	43
.25M	14	1	42,54	6	3,34	0,798	56
.5M	1	1	32,216	9	3,68	3,67	82
.5M	2	2	58,5	3	1,92	7,971	45
.5M	3	1	42,29	13	4	3,1	74
.5M	4	2	60,9	11	3,83	4,481	52
.5M	5	1	0	4	3,26	0	46
.5M	6	2	57,76	10	3,5	2,23	53
.5M	7	1	45,41	17	2,98	0,885	69
.5M	8	2	53,19	5	3,05	0,682	62
.5M	9	2	62,05	6	3,57	1,506	69
.5M	10	1	26,445	10	4,3	1,704	72
.5M	11	1	26,875	9	2,29	0,755	73
.5M	12	2	46,13	9	4,44	0,4665	75
.5M	13	2	31,1175	10	4,45	0,0289	79
.5M	14	2	45,1	9	3,46	0,741	66
.5M	15	2	51,245	8	5,42	0,337	72
.5M	16	2	40,445	9	4,05	0,434	68
.5M	17	2	35,11	7	3,57	0,407	67
.5M	18	2	31,397	7	3,42	0,857	58
.5M	19	2	37,09	6	3,88	0,345	69
.5M	20	1	37,23	5	2,83	0,729	50
.75M	1	1	57,376	7	2,89	4,977	42
.75M	2	1	59,38	6	2,75	1,44	48
.75M	3	1	45,24	9	3,15	2,373	58
.75M	4	1	44,16	6	2,76	0,908	59
.75M	5	1	45,32	6	4	3,006	58
.75M	6	2	45,007	6	4,3	0,536	62
.75M	7	2	44,72	8	4,35	0,461	67
.75M	8	2	41,805	9	4,15	0,62	71
1M	1	1	25,27	5	4,44	25,27	60
1M	2	1	20,24	7	4,75	20,24	65
1M	3	1	45,97	8	3,96	45,97	63
1M	4	1	51,03	7	4,35	51,03	55
1M	5	2	49,9	6	5,43	49,9	63
1M	6	1	42,7375	7	3,56	42,7375	56