



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

INDUCCIÓN DE MUTACIONES FOLIARES EN LISIANTHUS
(*Eustoma grandiflorum*) UTILIZANDO AGENTES
MUTAGÉNICOS FÍSICOS Y QUÍMICOS

ULICES IVAN SANTOS-PÉREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

Mayo de 2013

La presente tesis titulada: "Inducción de mutaciones foliares en *lisanthus (Eustoma grandiflorum)* utilizando agentes mutagénicos físicos y químicos" realizada por el alumno: **Ulices Ivan Santos Pérez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

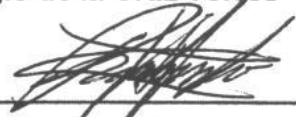
**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
Dr. Guillermo Carrillo Castañeda

ASESOR: 
Dra. Martha Elena Pedraza Santos

ASESOR: 
Dr. Eulogio de la Cruz Torres

ASESOR: 
Dr. Ricardo Lobato Ortiz

ASESOR: 
Dr. Tarsicio Corona Torres

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2013

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ponerme en este camino en donde he tenido un gran aprendizaje y a mi **Virgen de Guadalupe** por acompañarme y ver finalizado este sueño.

México y su ciudadanía por apoyarme a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económicamente brindado durante mis estudios a nivel Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo centro de enseñanza y aprendizaje le agradezco por recibirme en el posgrado de Recursos Genéticos y Productividad – Genética, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación.

A mis padres **Donaciano Santos Samano** y **Francisca Pérez Aguirre** así como mis hermanos **Gustavo** y **Pablo Cesar**, por ser el pilar y la fuerza necesaria para poder vencer los obstáculos y ver finalizada esta meta.

Al **Dr. Guillermo Carrillo Castañeda**, por su interminable paciencia y consejos brindados durante mi estancia.

A la **Dra. Martha E. Pedraza Santos**, por su apoyo incondicional en las diferentes etapas de mi vida.

A los **Dres. Ricardo Lobato Ortiz, Tarsicio Corona Torres y Eulogio De la Cruz Torres**, por el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A **Dios** por darme la fuerza y la sabiduría y a mi **Virgen de Guadalupe** por acompañarme en este caminar y poder ver alcanzada una meta más en mi vida.

El motor principal y lo que me impulsa a no dejarme vencer que es mi familia a mi papi **Donaciano Santos Samano** y a mi mami luchadora incansable que va conmigo en todo momento **Francisca Pérez Aguirre** y los dos seres que no me dejan solo y siempre están para mí en cualquier momento mis hermano **Gustavo** y **Pablo Cesar**.

Al **Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, Dra. Martha E. Pedraza Santos, Dr. Ricardo Lobato Ortiz, Dr. Tarsicio Corona Torres** y **Dr. Eulogio de la Cruz Torres**, por su confianza depositada en mí y por sus conocimientos brindados para mi formación profesional y personal.

A mis amigos que estuvieron siempre conmigo en cada uno de los momentos buenos y malos: **Yury, Salvador, Omar, Aurelio, Enrique, Olga, Esaú, Mayra, Fanny, Víctor, Ramón, Geymy, Fernando, América, Osvaldo, Yolita, Sandra, Lorena**, la **Sra. Dalila** y el **Sr. Ismael**, sé que me llevo grandes amigos con los cuales puedo confiar siempre, gracias por el apoyo.

Así como también mis amigos que siempre han estado conmigo a pesar de la distancia, **Ada, Dulce, Viry, Indy, Nanci, Lucio, Paulo, Viri, Susana, Araceli, Mariela, Cheli, Atenas, Fatima** y **Sarita**.

¡Ad Iesum per Mariam ad Iesum Maria!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv
CAPITULO I	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPITULO II	1
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
2.1 El cultivo de lisianthus	1
2.1.1 Origen.....	1
2.1.2 Clasificación y descripción botánica.....	2
2.2 Características vegetativas	3
2.2.1 Altura de la planta.....	3
2.3 Características de la hoja.....	3
2.4 Producción de lisianthus.....	4
2.5 Germinación convencional	4
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de lisianthus	5
2.7 Germinación <i>in vitro</i> de lisianthus.....	6

2.8 Mejoramiento genético de plantas.....	7
2.9 Mejoramiento genético de lisianthus	7
2.10 Mutagénesis	8
2.10.1 Agentes mutagénicos.....	10
2.10.2 Agentes químicos.....	11
2.10.2.1 Análogos de bases.....	11
2.10.2.2 Agentes que reaccionan con el ADN.....	11
2.10.2.3 Agentes alquilantes.....	12
2.10.2.4 Agentes intercalantes.....	12
2.11 Agentes físicos.....	13
2.11.1 Luz ultravioleta	13
2.11.2 Radiación ionizante	14
2.12 Especies florales mutagénicas.....	14
III. Inducción de mutaciones en <i>Eustoma grandiflorum</i> con Etil metanosulfonato (EMS)	16
RESUMEN	16
3.1 INTRODUCCIÓN	17
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.2.1 Material vegetal.....	19
3.2.2 Material químico.....	19

3.2.3 Medios de cultivo.....	19
3.2.4 Desinfección de la semilla.	19
3.2.5 Desinfección de las yemas axilares.....	20
3.2.6 Concentración de las soluciones de EMS y tiempos de exposición de la semilla.	20
3.2.7 Soluciones de EMS y tiempos de exposición de segmentos foliares y segmentos de callo.	21
3.2.8 Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀).	22
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.3.1 Determinación del DL ₅₀ para semilla.	24
3.3.2 Determinación de la DL50 en explantes de lisianthus.....	25
3.3.3 Desarrollo de los segmentos de hoja expuestos a las soluciones de EMS.	31
3.3.4 Tasa de mutación obtenida en las plántulas regeneradas.	33
3.3.5 Determinación de color en las plántulas con diferencia en la pigmentación foliar.	38
3.3.6 Tasa de mutación de semillas tratadas en la solución de EMS.....	38
3.3.7 Desarrollo de los segmentos de hoja expuestos al EMS.....	40
3.3.8 Tasa de mutación de las plántulas regeneradas de segmentos de hoja previamente tratados con la solución de EMS.....	41

3.3.9 Determinación de color en plántulas mutantes con fenotipo de pigmentación foliar.	45
3.4 CONCLUSIONES.....	47
3.5 BIBLIOGRAFÍA	48
CAPITULO IV.....	53
IV. Inducción de mutantes en <i>Eustoma grandiflorum</i> con radiación gamma Co^{60}	53
RESUMEN	53
4.1 INTRODUCCIÓN	54
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.2.1 Material vegetal.	56
4.2.2 Medios de Cultivo.	56
4.2.3 Desinfección de las yemas axilares.....	56
4.2.4 Acondicionamiento del material vegetal antes de la irradiación.	57
4.2.5 Irradiación del material vegetal.....	57
4.2.6 Cultivo <i>in vitro</i> del material irradiado.....	58
4.2.7 La radiosensibilidad de la semilla.	59
4.2.8 Radiosensibilidad de vitroplántulas, callos y secciones de hoja.	59
4.2.9 Determinación de la tasa de mutación.	60

4.2.10 Determinación de color en plántulas mutantes en la pigmentación foliar.	60
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.3.1 Determinación de la DL ₅₀ en semillas irradiadas (Co ⁶⁰).	61
4.3.2 Efecto en la fisiología de la semilla irradiada.....	62
4.3.3 Efecto de la radiosensibilidad observada en vitroplántulas y explantes.....	65
4.3.4 Tasa de mutación obtenida de semillas expuestas a radiación gamma (Co ⁶⁰).....	70
4.3.5 Tasa de mutación obtenida de vitroplántulas irradiadas (Co ⁶⁰).....	72
4.3.6 Determinación de color en plántulas mutantes en la pigmentación foliar.	77
4.4 CONCLUSIONES.....	77
4.5 LITERATURA CITADA.....	78
CAPITULO V.....	81
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	81
CAPITULO VI.....	84
VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	84
CAPITULO VII.....	86
VII. Bibliografía General.....	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de las soluciones de EMS (v/v) y tiempo (min) de exposición de la semilla.....	21
Cuadro 2. Concentración de las soluciones de EMS (% v/v) y tiempo (min) de exposición de los segmentos foliares y de callo.	21
Cuadro 3. Respuesta de la semilla, expuesta a las soluciones de EMS diluidas en 1 mL de agua destilada (v/v) durante los tiempos (min) indicados.....	25
Cuadro 4. Comportamiento de los segmentos de hoja al exponerlos a las soluciones de EMS cuya concentración es expresada en por ciento (v/v) durante los tiempos (minutos) indicados.....	27
Cuadro 5. Comportamiento de los segmentos de callo al exponerlos a las soluciones de EMS cuya concentración es expresada en por ciento (v/v) durante los tiempos (minutos) indicados.....	30
Cuadro 6. Efecto en el desarrollo de explantes de hoja expuestos a las soluciones de EMS (%) y tiempos (min) de exposición indicados.	33
Cuadro 7. Plántulas regeneradas con variaciones de la pigmentación de las hojas y su tasa de mutación.	35
Cuadro 8. Plántulas regeneradas con variaciones de la morfología de las hojas y su tasa de mutación.	36
Cuadro 9. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación.	37

Cuadro 10. Determinación de la pigmentación en la lamina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas al agente químico EMS de acuerdo con las cartas de color de Munsell.....	39
Cuadro 11. Plántulas regeneradas con variaciones de la pigmentación de las hojas y el desarrollo en la plántula y su tasa de mutación.....	39
Cuadro 12. Efecto mostrado en el desarrollo de los segmentos de hoja después de ser expuestos en la solución 10 % de EMS durante 20 min. ..	40
Cuadro 13. Plántulas regeneradas con variaciones en la pigmentación foliar y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.....	42
Cuadro 14. Plántulas regeneradas con variaciones en la morfología y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.....	43
Cuadro 15. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.....	44
Cuadro 16. Determinación de la pigmentación en la lamina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas al agente químico EMS de acuerdo con las cartas de color de Munsell.....	45
Cuadro 17. Dosis de irradiación con rayos gamma (Co^{60}) para material vegetal de <i>E. grandiflorum</i>	58
Cuadro 18. Agrupamiento de semillas de <i>E. grandiflorum</i> según su efecto causado por la irradiación con rayos gamma (Co^{60}) en la germinación.....	63
Cuadro 19. Radiosensibilidad de vitroplántulas de <i>Eustoma grandiflorum</i> a la radiación gamma (Co^{60}).....	66

Cuadro 20. Respuesta de vitroplántulas de <i>E. grandiflorum</i> expuestas a radiación gamma Co^{60}	67
Cuadro 21. Efecto de la radiosensibilidad de vitroplántulas de <i>E. grandiflorum</i> a la irradiación con rayos gamma (Co^{60}).	69
Cuadro 22. Respuesta morfogénica de vitroplántulas de <i>E. grandiflorum</i> expuestas a radiación gamma de Co^{60} para determinar la radiosensibilidad.	70
Cuadro 23. Mutantes obtenidos de semillas de <i>E. grandiflorum</i> con radiación gamma (Co^{60}) y su tasa de mutación. Número total de semillas 1800.	71
Cuadro 24. Plántulas regeneradas con variaciones en la pigmentación foliar y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).	73
Cuadro 25. Plántulas regeneradas con variaciones en la morfología y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).	74
Cuadro 26. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).	75
Cuadro 27. Determinación de la pigmentación en la lamina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas a radiación gamma (Co^{60}) de acuerdo a las cartas de color de Munsell.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Plántulas mutantes desarrolladas de semillas expuestas a la solución 20 % EMS durante 20 min; A) Testigo, B) Desarrollo, C y D) Pigmentación 46
- Figura 2.** Fenotipo de las vitroplántulas mutantes con las diferentes dosis de EMS: A) Testigo, B) Hoja ancha nervadura abultada, C) Hoja anche de nervadura soldada, D) Pigmentación verde claro, E) Hojas largas, F) Hojas anchas, G) Pigmentación variegado y H) Fenotipo erecto. 46
- Figura 3.** Fenotipo de las vitroplántulas mutantes expuestas en la solución 10 %, 20 min, A) Testigo, B) Hoja pequeñas, C) Pigmentación variegado, D) Desarrollo pequeño, E) Desarrollo erecto hojas erectas, F) Hojas largas y G) Hoja ancha. 47
- Figura 4.** Incremento y/o reducción de la germinación ha los 5, 10, 15 y 30 días después de haberse realizado la siembra..... 62
- Figura 5.** Agrupamiento obtenido por el efecto ocasionado por la radiación gamma (Co^{60}) en la germinación de semillas de *E. grandiflorum*. 64
- Figura 6.** Pigmentación y morfología de plántulas provenientes de semillas irradiadas a dosis de 100 y 125 Gy. 71
- Figura 7.** Plántulas mutantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) testigo, B) desarrollo lento, C) hojas redondas, D y G) color verde claro y E) hojas pequeñas. 72
- Figura 8.** Fenotipo de las vitroplántulas de *E. grandiflorum* mutantes irradiadas (Co^{60}) A) Testigo, B) Pigmentación verde oscuro, C) Hoja ancha con ápice ovalado, D) Hoja ancha con nervadura prominente, E)

Hojas erectas, F) Hoja anchas, G) Hoja ápice pinnado, H)
Pigmentación clara e I) Hojas largas y delgadas. 76

RESUMEN

La floricultura es una actividad donde los fitomejoradores tienen la necesidad de innovar constantemente en la forma, color, aroma de las flores y en el follaje. *Eustoma grandiflorum* (lisianthus), es una novedad en la floricultura por la diversidad de colores, formas y tamaños de las flores; esto a través de mejoramiento genético clásico ó de mutaciones inducidas. La idea de inducir mutaciones con fines de mejoramiento surgió en el primer cuarto del siglo pasado. La aplicación de EMS en semillas, callos o explantes aumenta la posibilidad de encontrar mutantes ya que causa cambios en el ADN dando lugar a variabilidad genética. En este estudio se utilizaron semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 20 % v/v durante 20 min posteriormente se colocaron en cajas petri en solución de EMS (20 % v/v) y un testigo de agua destilada estéril por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, las semillas fueron lavadas con agua estéril y se colocaron en medio nutritivo *in vitro*. El porcentaje de germinación fue mayor en solución con EMS (76.6 %) comparado con el tratamiento testigo (61.0 %). Hojas provenientes de vitroplantas fueron colocadas en cajas petri con la solución EMS (10 % v/v) expuestas 20 min, una vez transcurrido ese tiempo se lavaron con agua estéril y colocadas en medio nutritivo. Los resultados mostraron que con 10 % de EMS se obtuvo 61.2 % de regeneración y 22.8 % de plántulas con fenotipo diferente en pigmentación, morfología y desarrollo. La radiación gamma (Co^{60}) se ha utilizado con la finalidad de inducir mutaciones, en este estudio se irradiaron semillas con dosis de 50-500 Gy a intervalos de 50 y un testigo

sin irradiar. Las semillas irradiadas fueron sembradas *in vitro*. Se produjo radioestimulación en el intervalo de 50 y 100 Gy aumentando 20 % la germinación en comparación con el testigo. Con 150 a 450 Gy, se redujo 10 % la germinación y la dosis de 500 Gy produjo letalidad total. Las vitroplántulas provenientes de yemas axilares, fueron expuestas a la radiación con dosis de 0.5 - 100 Gy y posteriormente colocadas en medio nutritivo. La dosis de 36 Gy mostró efectos superiores en la regeneración a partir de callo y brote, las dosis de 2, 2.5 y 3 Gy tuvieron efecto en la capacidad regenerativa de brotes.

**Induction of foliar mutations in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by
physical and chemical mutagenic agents**

SUMMARY

Floriculture is an activity that requires continuous breeding efforts to get innovation concerning form, color, scent and foliage. *Eustoma grandiflorum* (lisianthus), is a novelty in floriculture by the diversity of colors, shapes and sizes of flowers, that have been obtained through classical breeding or induced mutations. The use of mutation induction as a tool for breeding purposes began on 1928, with the experiments of Stadler, irradiating barley seeds, to generate genetic variation. EMS application in seeds, calluses or explants increases the possibility of finding mutants because it causes changes in the DNA resulting in genetic variation. In this study seeds were disinfested with sodium hypochlorite at 20% v / v for 20 min, then placed in petri dishes in EMS solution (20% v / v) having a control using with sterile distilled water during 20 min. After this time, the seeds were washed with sterile water and placed in nutritive medium *in vitro*. The results showed that with 10% of EMS 61.2% of plant regeneration was obtained, and also 22.8% of seedlings with phenotype exhibiting different pigmentation, morphology and development. Gamma radiation (Co^{60}) have been used in order to induce mutations, in this study, seeds were irradiated with doses of 50-500 Gy with intervals of 50 Gy among treatments. Non irradiated seeds were used as control Both irradiated and non irradiated seeds were sown in vitro.

Radioestimulation occurred in the interval from 50 to 100 Gy, exhibiting that germination increased 20% over the control. With 150-450 Gy, germination 10% and 500 Gy induced total lethality. Plantlets from axillary buds were exposed to radiation doses from 0.5 to 100 Gy and then placed in nutritive medium. The 36 Gy dose showed superior effects on regeneration from callus and bud, doses of 2, 2.5 and 3 Gy had no effect on the regenerative capacity.



CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La floricultura es una parte muy importante en la industria hortícola. El valor global de la floricultura se estima de 100 - 150 millones de euros (150 millones de dólares EE.UU.) con los principales mercados en Europa, Norteamérica y Japón (Chandler y Tanaka 2007). Plantas con flores grandes se utilizan ya sea, en el sector de la floricultura donde las flores cosechadas son el producto final, o la industria de flores para maceta, donde las plantas se venden para el hogar o con fines de jardinería urbana. La industria de la floricultura es importante para la economía de varios países en desarrollo, como Costa Rica, Colombia, Kenia, Etiopía y Ecuador.

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 mayoría de las plantas ornamentales económicamente importantes son flores de corte que provienen de propagación vegetativa. Durante muchos años, las nuevas variedades fueron producto de la hibridación cruzada, donde las características a



modificar (mejora de la flor, color, vida en florero, aroma y forma) son siempre con el objetivo de beneficiar al consumidor, todas las modificaciones que agregan valor al producto final, incluidas la resistencia a enfermedades, sequía, insectos y la reducción en la senescencia foliar son atractivos desde el punto de vista del marketing (Chandler y Tanaka, 2007; Shibata, 2008).

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; Predieri, 2001; 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 y Häggman, 2007)

A pesar de que genes potencialmente útiles en la floricultura han sido identificados y se ha aprendido de los factores genéticos así como mecanismos moleculares que subyacen a fenotipos, sólo hay variedades modificadas en el color de flores de clavel y rosas, en el mercado (Chandler y Brugliera, 2010). En gran medida esto se debe a las barreras financieras únicas de acceso al mercado para las variedades genéticamente modificadas de cultivos de flores, incluyendo el uso de las tasas de la tecnología y los costos de la aprobación regulatoria. Con base en lo anteriormente señalado, los objetivos de la presente investigación fueron:

General:

Inducir mutaciones en plantas de *lisianthus* mediante el uso de un agente químico (Etil metanosulfonato) y un agente físico (radiación gamma), a partir de tejidos cultivados *in vitro*.

Específicos:

Desarrollar un protocolo de cultivo *in vitro* por las vías organogénesis y embriogénesis para *lisianthus*.

Inducir variabilidad genética mediante el uso de radiación gamma Co^{60} y Etil metanosulfonato en plantas *in vitro* de *lisianthus*.



CAPITULO II

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de *lisianthus*

2.1.1 Origen

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 (Shinner, 1957; Wood y 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 y 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 (Bárbaro *et al.*, 2009).



2.1.2 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.)

Las plantas pertenecientes a la familia Gentianaceae son rizomatosas y alcanzan una altura de entre 60 y 80 cm de altura, autores como Klingaman (1983) y Venning (1992) afirman que el *lisianthus* es una planta herbácea anual. Planta erecta a menudo con una roseta de hojas basales. 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 la hojas del clavel; flores vistosas con largos peciolo, solitarias o en panículas, cáliz largo con lóbulos en la quilla de 15 a 20 mm de longitud, acuminado; corola penta o hexabulada campanulada, compuesta por 5 a 6 lóbulos azules de 2 a 3 cm de longitud, morados y ocasionalmente blancos o rosas.



2.2 Características vegetativas

2.2.1 Altura de la planta

Las primeras variedades de *lisianthus* introducidas en el mercado de los EE.UU. a principios de 1980 fueron flores para corte. Por lo general eran los tallos individuales con ramas basales pocas o ninguna. La altura de las plantas de corte era variada de 61 a 91 cm, dependiendo de la época del año en que las plantas fueran cultivadas y de la variedad. Incluso algunas líneas han llegado a medir de 121 a 152 cm de altura. Cuando se considera que los cultivares enanos son sólo de 15 a 30 cm de altura, el acervo genético que está disponible sobre altura de la planta es asombroso en comparación con los cultivos de muchas flores (Harbaugh 2007).

2.3 Características de la hoja

Sus hojas son opuestas, sésiles, y glaucos. Las hojas son más grande en la porción basal de las plantas y, a menudo son > 12.7 cm de largo y 7.6 cm de ancho. Son mucho más pequeñas en la parte alta del tallo, hojas menores de 5 cm de largo y 1.3 cm de ancho, sus características varían significativamente entre los cultivares. La forma de las hojas por lo general son de ovadas a oblongas, pero en algunas selecciones son oblanceoladas o lanceoladas. En algunos cultivares las hojas de inflorescencia puede parecer lineales. El rango de colores de las hojas puede ser amplio desde gris-verde (similar a clavel), verde claro, verde oscuro, a casi un azul-verde, las hojas pueden ser muy atractivas o indeseables. Las características de las hojas son probablemente más importantes en los cultivares para macetas, ya que las hojas inferiores se extraen de las flores de corte cuando los tallos se cosechan (Harbaugh 2007).



2.4 Producción de *lisianthus*

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 arrosamiento. 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 *et al*, 2009).

2.5 Germinación convencional

El costo de la plántula es relativamente alto, debido a que presenta una germinación no uniforme, lo que dificulta la plantación automática en la cama de germinación (Pérgola *et al*, 1992). La siembra se realiza en charolas plásticas preparando un sustrato con peat moss y perlita todo esto debe de ser estéril, la semilla se cubre con una capa ligera de vermiculita. El sustrato debe mantenerse húmedo hasta la germinación con una temperatura de 20 a 24 °C manteniendo un pH entre 6 y 6.5. Una vez emergida la plántula, las charolas son colocadas en un lugar ventilado y temperatura no menor a 15 °C y no mayor de 27 °C. Se recomienda fertilizar con nitrato de calcio (150 ppm). Se debe evitar temperaturas extremas debido a que favorece el arrosamiento, también prevenir enfermedades fungosas. 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 (Domínguez, 2002).

2.6 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 (Semeniuk y Griesbach, 1987).

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

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.



Damiano *et al.* (1986) obtuvieron la propagación *in vitro* de lisianthus en medio con las sales minerales MS (1962) adicionado con ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), tiamina (0.1 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}), BA (0.3 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y bacto-agar (8 g L^{-1}).

En semillas de lisianthus se han obtenido porcentajes de germinación de 98 - 100 %, cultivadas *in vitro* en medio de cultivo de Brooks y Hough (1958), suplementado con ácido giberelico AG_3 (1 mg L^{-1}) y carbón vegetal activado. Además, estos investigadores proporcionaron un protocolo de micropropagación que inicia a partir de yemas axilares de plantas adultas, cultivadas en MS (1962) a 100 %, adicionado con ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), tiamina (0.1 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}), BA (0.3 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y bacto-agar (8 g L^{-1}). La tasa de multiplicación al usar este protocolo fue desde 3.3 hasta 9 brotes por explante.

2.7 Germinación *in vitro* de lisianthus

En Italia y otros países como México, el lisianthus presenta varias dificultades para su introducción debido a los altos costos de producción, entre los que destacan el elevado costo de las plántulas, el prolongado ciclo de producción y problemas en la conclusión del ciclo ontogénico que llega a ocurrir en algunas ocasiones (Pérgola *et al.*, 1992), debido principalmente a que no ocurre una germinación uniforme lo que dificulta la automatización de la producción de plántulas, aunado a su lento desarrollo (Pérgola



et al, 1992). En condiciones normales de producción la germinación y la emergencia ocurre en un lapso de 10 a 20 días (Jiménez, 1990).

La germinación *in vitro* de las semillas de lisianthus permite reducir el tiempo de obtención de plántulas que estén en condiciones de ser trasplantadas a suelo el porcentaje de germinación va de un 98 a 100 %, germinando en los primeros 6 días a partir de la siembra (Damiano *et al.*, 1989).

2.8 Mejoramiento genético de plantas

En los programas de mejoramiento es necesario contar con una amplia base genética garantizando la variabilidad y así seleccionar los mejores genotipos. En esencia este programa consiste en tres fases: generar variabilidad genética, selección de genotipos, y evaluación de los genotipos seleccionados; el cultivo de tejidos, la inducción de mutaciones y la transformación genética, son herramientas que ayudan en la inducción de variabilidad (Novak y Brunner, 1992)

2.9 Mejoramiento genético de lisianthus

Hasta la fecha, el desarrollo de formas vegetales a través de diversas técnicas como la biotecnología o la ingeniería genética, no parecen haber afectado a lisianthus en gran medida con la liberación de nuevas variedades transformadas. Sin embargo, parte de este trabajo lo realiza el sector privado y no se puede saber los avances en la investigación o el estudio en curso. Recientemente, varios investigadores han reportado la transformación de lisianthus mediante ingeniería genética (Deroles *et al.*, 1993;



Handa y Deroles, 2000). Ha habido un trabajo considerable en la comprensión y la alteración de color de la flor (Deroles *et al.*, 1995; Ledger *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2002; Schwinn *et al.*, 1997). Además, se está investigando la fragancia así como, modificar el tiempo de la floración (Zacai y Edri, 2002).

2.10 Mutagénesis

El material genético puede sufrir cambios conocidos como mutaciones y pueden ser espontáneos o por acción de ciertos agentes físicos y químicos. Las mutaciones cambian el genotipo, alterando la secuencia de bases en el ADN. Dependiendo de la extensión del cambio, se producirán mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas. Existen una gran variedad de agentes físicos y químicos que pueden inducir mutaciones. Las mutaciones inducidas se han utilizado para mejorar cultivos de importancia mundial tales como el trigo, arroz, cebada, algodón, cacahuate y frijol, que son propagados por semilla. Dentro de la industria mundial de las flores, la cual siempre se a nutrido de la novedad, siempre se ha buscado un medio para ampliar el acervo genético de la floricultura como insumo en la generación, de nuevas variedades comerciales. Este conocimiento se está aplicando ahora al estudio de una amplia gama de flores, para proporcionar un medio de selección de color que modifiquen estas especies no solo en color sino en varias de sus características fundamentales, (Clark *et al.*, 2004). Algunas características que han recibido atención incluyen aroma floral, flores y morfología de la planta, la senescencia de las flores, tanto en el puesto de plantas, la cosecha y la resistencia a las enfermedades (Tanaka *et al.*, 2005).



La idea de provocar mutaciones artificialmente y emplearlas con fines de mejoramiento genético fue planteada desde hace casi 70 años y desde entonces se ha progresado notablemente en este campo. No obstante, un gran número de autores recomiendan su aplicación sólo como un método complementario de las técnicas convencionales del mejoramiento genético, el cual mediante la técnica de cultivo *in vitro* ha dado la posibilidad de selección de diferentes mutantes en los cultivos. Uno de los avances más notables de estos sistemas, es el fácil tratamiento de grandes poblaciones de células con agentes modificadores del material genético. La aplicación de sustancias mutagénicas a las poblaciones celulares, hacen que aumente la posibilidad de encontrar mutantes beneficiosos, debido a los cambios provocados en la estructura celular de las plantas, por las exposiciones de los callos o explantes a los agentes modificadores (Santana, 1996).

El uso de mutágenos físicos como las radiaciones ionizantes, los rayos X, rayos gamma y neutrones o mutágenos químicos como el Etil Metano Sulfonato, el Metil Metano Sulfonato entre otros, que son usados para inducir variación están bien establecidos (Parry et al., 2009). En las plantas propagadas vegetativamente, muchos de los mutantes se obtuvieron a partir de la irradiación de sus raíces, estaquillas de tallo, hojas sueltas, y las plantas inactivas.

De acuerdo con la base de datos de la 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 (Ahloowalia y Maluszynski, 2001).

2.10.1 Agentes mutagénicos

Con la elucidación de consideraciones teóricas de tipo y dosis de mutágeno y la manera de presentarse las mutaciones genéticas, la mutagénesis se convirtió de una excentricidad a una herramienta de mejoramiento. Los primeros intentos para modificar plantas *in vivo*, se realizaron con rayos X y ultravioleta reportados por Alberto Pirovano en Italia en 1922. A la fecha se conocen otros agentes físicos que inducen mutaciones, entre los cuales se mencionan rayos gama, neutrones, protones y partículas alfa y beta. Cuando en un sistema de mejoramiento *in vitro* se inducen mutaciones se tiene la posibilidad de encontrar de 10 a 20 veces más variantes que en un sistema donde se produce variación somaclonal espontánea, sin embargo, las condiciones óptimas para la mutagénesis pueden variar dependiendo de la especie (Gutiérrez *et al.*, 2003).

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



2.10.2 Agentes químicos

En años recientes se ha mostrado un creciente interés en el uso de agentes químicos, ya que comparado con los agentes físicos, son estos en algunas ocasiones más capaces de realizar mutaciones aun que generalmente son puntuales. Los agentes químicos que se utilizan con mayor frecuencia son: hidroxilamina, agentes quelantes tales como Etil Metanosulfonato (EMS), N-metil-N'-nitrosoguanidina (NG) y N-etil-N-nitrosourea, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2003).

2.10.2.1 Análogos de bases

Debido a su similitud estructural los análogos de bases como el 5-Bromouracilo o la 2-Aminopurina se incorporan en el DNA que se replica en lugar de las bases correspondientes timina y adenina. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el DNA, la replicación puede ocurrir normalmente aunque ocasionalmente, ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas en la copia de DNA.

2.10.2.2 Agentes que reaccionan con el ADN

Existen una serie de agentes químicos que reaccionan directamente sobre el ADN que no se está replicando ocasionando cambios químicos en las bases, lo que provoca un apareamiento incorrecto.

Acido nitroso (HNO₂). De amina la adenina a hipoxantina y la citosina a uracilo. Debido a las distintas propiedades de apareamiento de los productos de desaminación, producen transiciones.



Hidroxilamina (NH₂OH). Reacciona con la citosina donde el grupo amino es reemplazado por un grupo hidroxilamino. Este derivado de la citosina se aparea con adenina produciéndose transiciones GC ----> AT.

2.10.2.3 Agentes alquilantes

Otro grupo de productos químicos que afectan al ADN que no se replica son los agentes alquilantes, que incluyen el etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietil sulfato (DES), diepoxi butano (DEB), N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), N-metil-N-nitroso urea y gas mostaza. La mutagénesis con agentes alquilantes se produce a través de varias vías ya que originan la formación de un espectro completo de bases alquiladas en el AND lo que origina transiciones y deleciones.

El etil metano sulfonato (EMS) introduce un metilo en la guanina que ya no se aparea con la citosina provocando la transición GC ----> AT.

El N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), cancerígeno, es uno de los mutágenos químicos más efectivos.

2.10.2.4 Agentes intercalantes

Un grupo interesante de sustancias, acridinas y bromuro de etidio, son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdeleciones en el ADN, originando mutaciones por corrimiento de lectura.



2.11 Agentes físicos

En general, el efecto ocasionado es proporcional a la energía absorbida por un tejido en particular, el poder de penetración varía para cada uno, desde fracciones de milímetros hasta algunos centímetros. Las mutaciones inducidas por rayos ultravioleta son terminales y las inducidas por rayos X son intersticiales y asociados con el rompimiento de cromosomas (Gutiérrez *et al.*, 2003).

2.11.1 Luz ultravioleta

Uno de los agentes mutagénicos más efectivos es la radiación ultravioleta de longitud de onda corta. La longitud de onda efectiva para la mutagénesis está comprendida entre los 200 y 300 nm con un óptimo a 254 nm que es la absorción máxima del ADN. La radiación a longitudes de onda entre 300 y 400 nm tiene menos efectos letales y mutagénicos que la luz UV de longitud de onda corta.

Los productos más importantes de la acción de la luz UV son dímeros (timina-timina; timina-citosina; citosina-citosina) que se forman entre pirimidinas (T, C) adyacentes, lo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación del ADN, la ADN polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición. El sol es una fuente poderosa de luz UV, pero una gran cantidad de esta radiación es eliminada al atravesar la capa de ozono en la atmósfera.



2.11.2 Radiación ionizante

La radiación ionizante es una forma de radiación más potente e incluye rayos de longitud de onda corta como los rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma. Esta radiación causa la ionización del agua y de otras sustancias; produciéndose indirectamente efectos mutagénicos debido a esta ionización. Entre las potentes especies químicas formadas por la radiación ionizante se encuentran radicales libres, siendo el más importante el radical hidroxilo (OH⁻). Los radicales libres reaccionan en la célula con macromoléculas, como el ADN, y las inactivan produciendo rupturas que dan lugar a cambios estructurales importantes como son las mutaciones cromosomales. A bajas dosis de radiación ionizante sólo ocurren unos cuantos impactos sobre el ADN, pero a mayores dosis ocurren impactos múltiples que conducen a la muerte de la célula. Al contrario que la radiación UV, la radiación ionizante penetra fácilmente el vidrio y otros materiales.

2.12 Especies florales mutagénicas

Otahola-Gómez *et al.*, (2001) realizó un ensayo en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzvelev) para la inducción de mutaciones en el color de las flores se irradiaron brotes en cultivo *in vitro* de 3 cm de largo utilizando la fuente de Co⁶⁰. La mayor sobrevivencia de los explantes irradiados se obtuvo con la dosis de 1.5 Krad y el mayor crecimiento con la dosis de 0.5 Krad. La dosis de 2.0 Krad afectó la sobrevivencia, el número de hojas/brote y la tasa de crecimiento. Se obtuvieron mutantes en el color de la flor en todas las dosis de irradiación utilizadas, sobresaliendo



la dosis de 1,0 Krad (60 % de mutantes) y 0,5 Krad (38.88 % de mutantes), siendo más frecuente el color cobre.



CAPITULO III

III. Inducción de mutaciones en *Eustoma grandiflorum* con Etil metanosulfonato (EMS)

En proceso de publicación en la revista Fitotecnia Mexicana

RESUMEN

La industria de flores de corte siempre se ha nutrido por la novedad ya sea en la forma de la flor, color, aroma y follaje; actualmente representa aproximadamente un tercio del valor del mercado mundial en la horticultura ornamental. *E. grandiflorum* (lisianthus) tiene flores de gran diversidad de colores, formas y tamaños de las flores. Dicha variación se logró a través de selección, proceso que requiere de mucho tiempo, esfuerzo y gran cantidad de plantas. La aplicación de mutágenos químicos como el EMS aumenta la posibilidad de encontrar mutantes por la exposición de semillas, callos o explantes debido a que causa cambios al nivel de ADN dando lugar a variabilidad genética. Las semillas fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio al 20 % v/v durante 20 min posteriormente colocadas en cajas petri en solución de EMS (20 % v/v) y un testigo de agua destilada estéril por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, los explantes fueron lavados con agua estéril y colocados en medio nutritivo *in vitro*. El porcentaje de germinación fue mayor en solución con EMS (76.6 %) comparado con el tratamiento testigo (61.0 %). Hojas provenientes de vitroplantas fueron colocadas en cajas petri con la solución EMS (10 % v/v) expuestas 20 min, una vez transcurrido ese tiempo se lavaron con agua estéril y colocadas en medio nutritivo. Los resultados mostraron que con 10 % de EMS se obtuvo 61.2 % de regeneración y 22.8 % de plántulas con fenotipo diferente en pigmentación, morfología y desarrollo.



3.1 INTRODUCCIÓN

La industria global de flores de corte se nutre de la novedad, dando un excedente de 27 billones de dólares en ventas anuales al menudeo en EE.UU. (Chandler, 2003). Las flores de corte representan aproximadamente un tercio del valor del mercado mundial de la horticultura ornamental.

En los últimos 13 años, *lisianthus* ha sido una especie estudiada ampliamente. Desde la actividad antioxidante del gen catalasa, así como, los genes implicados en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas durante el desarrollo de sus pétalos y la afectación que sufre en el cultivo *in vitro* debido a las citoquininas, auxinas y carbón activo, así como, también la función del etanol en la vida de florero y la producción de etileno. Por su valor económico se han hecho estudios donde, se reportan modificaciones de rasgos a través de la ingeniería genética para generar resistencia a enfermedades viroides y patógenas presentes en el cultivo de invernadero en donde también ha estudiado el efecto de la luz y el régimen de sombra para el desarrollo de las flores (Markham *et al.*, 2000; Paek y Hahn, 2000; Harbaugh *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2000; Kritzman *et al.*, 2000; Jamal *et al.*, 2001; Zaccai *et al.*, 2001; Zaccai y Edri, 2002; Noda *et al.*, 2004; El-Hamalawi y Stanghellini, 2005; Farokhzad, 2005; Cruz-Crespo, 2006; Yoshioka *et al.*, 2006; Aranovich *et al.*, 2007; Mumford *et al.*, 2008; Nalim *et al.*, 2009; Lugassi-Ben-Hamo *et al.*, 2010; Rezaee y Behmanesh, 2013).

A pesar de que *lisianthus* es un cultivo de reciente introducción en México se ha convertido en un cultivo importante por la gran variedad de colores de las flores, sin embargo los consumidores demandan nuevas variedades.



Los mutágenos químicos son importantes en el mejoramiento de plantas, éstos pueden causar cambios en la estructura de los genes, dando lugar a la variabilidad genética. (Silva *et al.*, 1998). A lo largo del tiempo muchos investigadores han reportado el papel que tienen los compuestos mutagénicos químicos en el aumento de la variabilidad genética en las plantas superiores (Ricardo y Ando, 1998; Chen, *et al.*, 2006; Kumar, *et al.*, 2009, Kozgar, *et al.*, 2010; Liu, *et al.*, 2011)

Los compuestos mutagénicos pueden provocar efectos secundarios en la planta como clorosis, la reducción de la germinación, plantas débiles, lo que lleva a la infertilidad o letalidad incluso parcial o total, disminuyendo la probabilidad de genotipos mutantes útiles (Silva, 1998).

Para tener la mayor eficiencia en la inducción de mutaciones, uno de los puntos importantes es conocer la dosis de letalidad del agente mutagénico, ya que es un aspecto importante conocer el grado de sensibilidad que tiene el material que se va a tratar (la especie, los callos, las flores, las vitroplántulas).

La carencia de variedades mexicanas limita las posibilidades de satisfacción de las necesidades de productores y consumidores. Por lo anterior el objetivo de este trabajo es determinar el efecto del EMS como agente inductor de variabilidad, como paso inicial para generar variedades con mejores valoraciones agronómicas para las condiciones de México.



3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal. Se usaron tres tipos de material vegetal de *E. grandiflorum* (lisianthus) color morado: a) semilla del híbrido F₁ Giseb, b) segmentos de tallos de plantas provenientes de un invernadero comercial y c) hojas de vitroplántulas regeneradas a partir de yemas axilares de plantas de la variedad mariachi.

3.2.2 Material químico. Ethyl methanesulfonate (EMS) SIGMA®

3.2.3 Medios de cultivo. Medio nutritivo de cultivo, medio base (MB), contiene sales inorgánicas del medio Murshige y Skoog (1962) modificado (comunicación personal Guillermo Carrillo Castañeda); medio base para semilla (MBS) contiene en cantidades expresadas por litro de medio, agua de coco 50 mL, sacarosa 30 g, agar (SIGMA®) 4 g; medio base para yemas y hojas (MBYH), es el medio MBS con 2, 4-Diclorofenoxiacético (2, 4-D) 0.12 mg y 6-Benzylaminopurina (6 BAP) 1.25 mg; Medio base para enraizar (MBR), es el medio MBS con ácido Indolbutírico (AIB) 1.0 mg. 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. Para el medio MBS se vertieron 7 mL, mientras que los medios restantes se usaron 20 mL por cada frasco de vidrio de 120 mL con tapa de plástico esterilizados.

3.2.4 Desinfección de la semilla. Para la desinfección superficial de la semilla ésta fue colocada en un pedazo de gasa y con una liga se formó una pequeña bolsa



para sumergirla durante 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % v/v (6 % de cloro activo) y BacDyn[®] 2 mL⁻¹ (solución de plata coloidal estable al 0.32 %). En una campana de flujo laminar frente a un mechero encendido, la solución se retiró para hacer tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

3.2.5 Desinfección de las yemas axilares. Segmentos de tallo fueron enjuagados y lavados con detergente y agua del grifo para colocarlos en un frasco de vidrio y someterlos a un proceso de desinfección superficial, que consistió en sumergirlos en una solución de alcohol etílico al 70 % v/v durante 30 segundos, posteriormente la solución de alcohol se retiró para sumergirlas durante 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % v/v (6 % de cloro activo) y BacDyn[®] 2 mL⁻¹ (solución de plata coloidal estable al 0.32 %). En una campana de flujo laminar frente a un mechero encendido, la solución se retiró para hacer tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

3.2.6 Concentración de las soluciones de EMS y tiempos de exposición de la semilla. Sobre la semilla desinfectada en una caja Petri de vidrio (55 x 15 mm) esterilizada se agregó 1 mL de solución de EMS de 10, 20 y 30 % v/v preparada con agua destilada estéril donde la semilla fue conservada durante los tiempos indicados en el Cuadro 1 para después enjuagarla tres veces con agua destilada estéril.



Cuadro 1. Concentración de las soluciones de EMS (v/v) y tiempo (min) de exposición de la semilla.

Material biológico	Tiempo	Concentración de la solución de EMS
Semillas	30	10, 20 y 30
	20	10, 20 y 30

3.2.7 Soluciones de EMS y tiempos de exposición de segmentos foliares y segmentos de callo. Segmentos foliares y de callo provenientes de cultivo *in vitro* (1 cm por 0.5 cm) fueron obtenidos bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Los segmentos se colocaron en una caja Petri de vidrio (55 x 15 mm) para sumergirlos en 1 mL de solución de EMS durante los tiempos indicados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Concentración de las soluciones de EMS (% v/v) y tiempo (min) de exposición de los segmentos foliares y de callo.

Material biológico	Tiempo	Concentración de la solución de EMS
Segmento foliar y callo	10	5, 7 y 10
	20	10, 14 y 20
	30	5, 7, 10, 20, 30 y 40



3.2.8 Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀). Bajo condiciones de asepsia, en la cámara de flujo laminar, la semilla desinfectada fue colocada en cajas Petri de vidrio estéril (55 x 15 mm) con 1 mL de la solución de EMS indicada.

Lotes de 100 semillas por tratamiento fueron sumergidas en soluciones de EMS (concentraciones de 10, 20 y 30 % v/v) y un tratamiento testigo (agua destilada) durante 30 y 20 min en agitación con la finalidad de garantizar el contacto permanente de la semilla con la solución, a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la campana de flujo laminar. Al concluir el tiempo de exposición, la semilla se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron 20 semillas por caja sobre el medio de cultivo. A partir de siete días después de la siembra se evaluó el porcentaje de contaminación, germinación y desarrollo.

De las hojas de vitroplántulas fueron hechos segmentos de 1 cm por 0.5 cm, al igual que los segmentos de callo en cajas Petri estériles bajo las condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Los segmentos se colocaron en una caja Petri de vidrio (55 x 15 mm) con 1 mL de la solución de EMS. Después de la exposición, los segmentos fueron lavados tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en cajas Petri con medio MBYH para incubarse en un cuarto manteniendo a la temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 70 – 80 % y 12 horas de luz, 8 de oscuridad. La capacidad de formación de callo y regeneración de brotes fueron evaluados y, cuando se obtuvieron plántulas, se observaron las diferencias morfológicas (forma y tamaño de las hojas, tallos, peciolo y pigmentación) y fisiológicas (velocidad de desarrollo) para de este modo identificar posibles mutaciones. Los segmentos de hoja y callo se



distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por dosis, para semillas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, además para ambos casos se usó como testigo agua destilada estéril. Las variables fueron sometidas a un análisis de varianza (ANDEVA) y se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias, esto se realizó usando el paquete estadístico SAS 9.0 (2011).

En la determinación de la DL_{50} (mortalidad ± 20) se tomó en cuenta el porcentaje de germinación, así como, el costo de la semilla, por lo cual se trabajó con una concentración que tuviera un buen porcentaje de germinación, se realizaron ensayos con 375 explantes (hojas y callos) y 100 semillas, los cuales fueron expuestos a la dosis y tiempo de la DL_{50} del agente EMS, bajo las condiciones descritas.



3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Determinación del DL₅₀ para semilla. Se observó una reducción de la germinación hasta 49.3 % en la semilla expuesta a 20 % de solución de EMS durante 30 min, comparada con el testigo (cuadro 3). Con este mismo tratamiento el porcentaje de semillas con desarrollo disminuyó (61.0) en comparación con el testigo (81.6). Respecto a la longitud de la hoja se observó que la plántula mantiene una tendencia hacia la disminución (mayor solución - mayor tiempo), la longitud disminuyó 0.30 cm con la solución de 30 % durante 30 min respecto al testigo. De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó la DL₅₀ (± 20) la cual fue una solución al 20 % durante 20 min.

En la respuesta de la semilla tratada con EMS, se observa una reducción en el desarrollo de la semilla de 55 % con tiempo de exposición de 30 min. Con estas condiciones se demuestra que EMS no solo afectó la germinación sino también el desarrollo de las plántulas de *E. grandiflorum*. Sin embargo Kozgar *et al* (2010). Trabajando con semillas del género *Vigna* tratadas con diferentes dosis (0.1 a 0.4 %), observó una mayor variabilidad respecto al rendimiento total de 96.98 %, esto en una solución a 0.4 % siendo este superior al resto de los tratamientos. Por lo cual, se puede concluir que es necesario realizar ensayos para poder determinar una DL₅₀ adecuada para cada especie.



Cuadro 3. Respuesta de la semilla, expuesta a las soluciones de EMS diluidas en 1 mL de agua destilada (v/v) durante los tiempos (min) indicados.

Solución (%)	Tiempo	Contaminación (%)	Germinación (%)	Semillas con desarrollo (%)	Longitud de hoja
Agua	20	20.0 ab*	84.3 a	81.6 a	0.80 a
10	20	30.0 a	54.6 b	46.6 c	0.63 ab
20	20	2.33 c	76.6 a	61.0 b	0.73 ab
30	20	11.6 bc	38.0 cd	21.6 e	0.71 ab
10	30	15.0 b	46.6 bc	32.3 d	0.70 ab
20	30	14.3 b	35.0 d	21.6 e	0.66 ab
30	30	13.3 b	38.0 cd	26.6 de	0.50 b
DMS		10.4	9.7	9.0	0.2

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$)

3.3.2 Determinación de la DL50 en explantes de lisianthus. Como criterio importante para determinar la $DL_{50} \pm 20$ fue la sobrevivencia. Se consideraron únicamente los explantes que al ser expuestos a las soluciones de EMS no se contaminaron; sin embargo, la contaminación jugó un papel importante tal y como se indica en el Cuadro 4, que hace referencia a lo ocurrido con los segmentos de hoja.

La mayor contaminación se observó (100 %) cuando los segmentos foliares se expusieron a la solución de 7 % durante 30 min y la menor (0 %) al exponerlos a la solución de 0 % durante 10, 20 y 30 min, en relación con el tratamiento testigo (53.3%)



que contenía agua destilada estéril (Cuadro 4). Los datos experimentales obtenidos indican que la contaminación observada no es causada por las soluciones del compuesto químico EMS por sí mismo, ya que, con la solución de menor concentración (7 %) se presentó la mayor contaminación de los explantes y cuando éstos fueron expuestos a la solución de 10 % durante los tres tiempo no se presentó contaminación y, por lo tanto es posible que la causa de la contaminación haya sido la condición fitosanitaria de las plantas.

El mayor porcentaje de viabilidad (66.6 %) se encontró cuando los explantes fueron expuestos a la solución de concentración 10 % durante un tiempo de 20 min y el menor (0 %) cuando la concentración de la solución fue de 7 y 14 % y el tiempo de exposición de 30 y 20 min respectivamente. En los explantes expuestos a la solución de concentración 5 % durante un tiempo de 30 min se observó 10 % de viabilidad. En el tratamiento testigo (agua destilada estéril), la viabilidad alcanzada fue de 71.4 % (Cuadro 4).

Las condiciones experimentales de los segmentos de callo en la cual presentaron una sobrevivencia cercana al 50 % del tratamiento testigo (30.0 %) son: solución 10 %, 30 min (36.3 %); solución 7 %, 30 min (30.3 %). Así mismo fueron dos las condiciones experimentales en donde la sobrevivencia media \pm 20 en relación al tratamiento testigo se observaron las cuales fueron: solución 7 %, 20 min (28.5 %); solución 10 %, 20 min (20.7 %).



Cuadro 4. Comportamiento de los segmentos de hoja al exponerlos a las soluciones de EMS cuya concentración es expresada en por ciento (v/v) durante los tiempos (minutos) indicados.

Concentración de la solución	Tiempo de exposición	No. total de segmentos	Contaminados (%)	Sin contaminar (%)	Sobrevivencia (%)	Mortalidad (%)
0	20	30	16 (53.3)	14 (46.6)	10 (71.4)	4 (28.5)
5	30	30	10 (33.3)	20 (66.6)	2 (10)	18 (90)
7	30	30	30 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10	30	30	0 (0)	30 (100)	6 (20)	24(80)
10	20	30	0 (0)	30 (100)	22 (66.6)	8 (33.3)
14	20	30	24 (80)	6 (20)	0 (0)	6 (100)
20	20	30	24 (80)	6 (20)	2 (33.3)	4 (66.6)
5	10	30	5 (16.6)	25(83.3)	9 (36)	16 (64)
7	10	30	2 (6.6)	26 (86.6)	3 (11.5)	23 (88.4)
10	10	30	0 (0)	30 (100)	11 (36.6)	19 (63.3)



El comportamiento que manifestaron los segmentos de callo se capturó en el Cuadro 5, donde se aprecia que el tratamiento testigo obtuvo un mayor porcentaje de contaminación (75.0 %) seguido por los explantes expuestos a la solución a 5 % durante 30 min (60.0 %), la menor contaminación (0.0 %) se presentó en explantes expuestos en una solución al 10 % durante los tiempos 10 y 20 min.

Respecto a la variable porcentaje de sobrevivencia se observó que los explantes de callo expuestos al agua destilada estéril mostraron el mayor porcentaje 60.0 %. En los segmentos de callo expuestos al compuesto químico EMS se observó que el mayor porcentaje de sobrevivencia (36.3 %) estuvo en los segmentos expuestos a la solución al 10 % durante 30 min y el menor (0 %) en los explantes expuestos a la solución al 14 % durante 20 min (Cuadro 5). Las condiciones experimentales en las que los segmentos foliares presentaron una sobrevivencia cercana al 50 % (ordenados de mayor a menos son: solución 10 %, 10 min (36.6 %); solución 5 %, 10 min (36.0 %); solución 20 %, 20 min (33.3 %)). Se tomó en consideración la $DL_{50} \pm 20$ obtenida en los segmentos de hoja expuestos en la solución al 10 % durante 20 min (66.6 %)

Nuevamente observamos que el compuesto químico como tal no es factor de contaminación, sin embargo, se notó que los segmentos de callo que sobrevivieron después de 15 días de cultivo se necrosaron. Por tal motivo únicamente se utilizaron los segmentos de hoja para el desarrollo del trabajo.

En primer lugar es preferible seleccionar mutantes que sean afectados preferentemente en un solo gen o, en el menor número de genes posible para que



estas plantas mutantes sean funcionales (a mayor dosis o tiempo, mayor número de eventos mutacionales por célula y por tanto mayor letalidad y anormalidades en la planta) y en segundo término tomando en cuenta los costos, disponibilidad de la semilla así como el compuesto químico EMS, se determinó considerar unas dosis que permitiera altos porcentajes de sobrevivencia. En consecuencia, la dosis a la que fueron sometidas las semillas así como los explantes fue a la solución de EMS de 10 % durante 20 minutos. En estas condiciones se logró obtener 67 % de sobrevivencia en los explantes foliares (Cuadro 4)



Cuadro 5. Comportamiento de los segmentos de callo al exponerlos a las soluciones de EMS cuya concentración es expresada en por ciento (v/v) durante los tiempos (minutos) indicados.

Concentración de la solución	Tiempo de exposición	No. total de segmentos	Contaminados (%)	Sin contaminar (%)	Sobrevivencia (%)	Mortalidad (%)
0	20	20	15 (75)	5 (25)	3 (60)	2 (40)
5	30	20	12 (60)	8 (40)	2 (25)	6 (75)
7	30	20	5 (25)	15 (75)	5 (33.3)	10 (66.6)
10	30	20	9 (45)	11 (55)	4 (36.3)	7 (63.6)
10	20	20	0 (0)	20 (100)	4 (20)	16 (80)
14	20	20	4 (20)	16 (80)	0 (0)	16 (100)
20	20	20	7 (35)	13 (65)	1 (7.7)	12 (92.3)
5	10	20	2 (10)	18 (90)	3 (16.6)	15 (83.3)
7	10	20	6 (30)	14 (70)	4 (28.5)	10 (71.4)
10	10	20	0 (0)	20 (100)	2 (10)	18 (90)



3.3.3 Desarrollo de los segmentos de hoja expuestos a las soluciones de EMS.

1.- Regeneración de callos. Los segmentos de hoja al ser expuestos a las soluciones de EMS mostraron una ligera variación en la respuesta a la formación de callo. Los segmentos expuesto a las soluciones al 10 % durante 20 min generaron en promedio el mayor número de callos (5.0) y en las condiciones de 5 %, 30 min; 10 %, 30 min; y 7 %, 10 min el menor número de callos (3.0) mientras que en el tratamiento testigo fue un promedio de 4.0 (agua destilada esterilizada). En relación a la variable diámetro de callo se encontró mayor variación que en la variable anterior ya que en la solución 5 % durante 30 min se obtuvo el mayor diámetro (1.7 cm) y el menor en la solución 5 % durante 10 min (0.9 cm), en el tratamiento testigo el diámetro promedio fue de 1.53 cm (Cuadro 6). Svetleva (2005) en frijol común obtuvo resultados similares con un mayor efecto en el crecimiento de callo (0.60 g) expuesto en la solución $2.5 \cdot 10^{-2}$ M durante 30 min, y un efecto inhibitorio durante 60 y 90 min (0.24 y 0.19 g respectivamente), esta tendencia encontrada se expreso en el primer subcultivo.

2.- Regeneración de brotes. A partir de los callos obtenidos se determino su capacidad de regeneración de brotes. El mayor porcentaje de explantes que generaron brotes fueron los que se expusieron a la solución de 10 % durante 10 min y 10 % durante 20 min (85.6 y 85.0 % respectivamente) y el menor se encontró en los expuestos a la solución 5 % durante 20 min (60.0 %). En el testigo se observó el mayor porcentaje de regeneración (95.3 %) (Cuadro 6).



3.- Variabilidad fenotípica. Las plántulas regeneradas de los callos mostraron variaciones en relación a las regeneradas de los callos testigo. Los resultados observados fueron los siguientes: en la solución al 10 %, 30 min, 18.3 % de las plántulas fueron diferentes al fenotipo silvestre, en la solución al 10 %, 20 min (15.0 %) y el menor porcentaje de plántulas diferentes (5.5 %) se encontró en las plántulas regeneradas en la solución 5 % durante 20 min (Cuadro 6). Jin, *et al.*, (2005) al exponer callos de trigo a una solución al 20 % durante 4 h observaron un 5.8 % de plántulas diferentes. A pesar de que son especies diferentes, puede apreciarse que estos autores han utilizado concentraciones muy altas y tiempos de exposición muy prolongados para obtener resultados relativamente poco satisfactorios, sin embargo la diferencia entre especies puede ser un factor por el cual existe esta diferencia en el grado de susceptibilidad.



Cuadro 6. Efecto en el desarrollo de explantes de hoja expuestos a las soluciones de EMS (%) y tiempos (min) de exposición indicados.

Solución (%)	Tiempo	Núm. promedio de callos por caja	Diámetro promedio de callo (cm)	Porcentaje de explantes con brotes	Porcentaje de explantes con fenotipo diferente**
0	20	4.0 ab*	1.33 abc	95.3 a	0.0 b
5	30	3.0 b	1.71 a	82.5 a	15.0 ab
10	30	3.0 b	1.59 ab	79.3 a	18.3 a
5	20	3.5 b	1.21 abc	60.0 a	5.5 ab
7	20	4.0 ab	1.32 abc	65.0 a	8.5 ab
10	20	5.0 a	1.10 abc	85.0 a	15.0 ab
5	10	4.3 a	0.90 c	83.3 a	16.6 ab
7	10	3.0 b	1.37 abc	66.6 a	10.0 ab
10	10	4.0 ab	1.06 bc	85.6 a	6.66 ab
DMS		1.45	0.65	61.0	18.7

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05) (= $P \leq 0.05$)

** Evaluación visual durante la fase de propagación *in vitro*.

3.3.4 Tasa de mutación obtenida en las plántulas regeneradas. El resultado que se obtuvo al exponer un total de 87 segmentos de hoja que previamente fueron expuestos a las soluciones de EMS (5, 7 y 10 %) fue la regeneración de 270 vitroplántulas de las cuales 75 presentaron características diferentes al tipo silvestre. Estas 75 plántulas mostraron diferencias fenotípicas a nivel foliar (pigmentación y



morfología) y de desarrollo *in vitro*, como se indica en los Cuadros 7 (pigmentación), 8 (morfología) y 9 (desarrollo).



Cuadro 7. Plántulas regeneradas con variaciones de la pigmentación de las hojas y su tasa de mutación.

No. total de explantes	Vitroplántulas regeneradas	Plántulas		Características de la pigmentación	Tasa de mutación
		regeneradas con pigmentación diferente	Tasa de mutación ¹		
87	270	23	0.0851	Coloración verde oscuro nervadura central verde claro (8 plántula)	0.0296
				Coloración verde claro mate (7 plántulas)	0.0259
				Coloración verde oscuro brillante (6 plántula)	0.0222
				Coloración variegado oscuro (70 %), claro (30 %) (1plántula)	0.0037
				Alvina (1 plántula)	0.0037

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 8. Plántulas regeneradas con variaciones de la morfología de las hojas y su tasa de mutación.

No. total de explantes	Plántulas			Tasa de mutación ¹	Características de la morfología de la hoja	Tasa de mutación
	Vitroplántulas regeneradas	regeneradas con morfología diferente				
135	270	31	0.1148	Hoja ancha, nervadura hundida (8)	0.0037	
				Hoja larga, nervadura normal (6)	0.0222	
				Hoja ancha, nervadura saltada (1)	0.0037	
				Hoja ancha, nervadura normal (16)	0.0592	

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 9. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación.

No. total de explantes	Vitroplántulas regeneradas	Plántulas regeneradas con desarrollo diferente	Tasa de mutación ¹	Características del desarrollo	Tasa de mutación
135	270	21	0.0777	Desarrollo compacto (3)	0.0111
				Desarrollo erecto, hojas erectas (5)	0.0185
				Desarrollo erecto, hojas erectas (nervadura hundida) (9)	0.0333
				Desarrollo erecto, hojas erectas (pigmentación clara) (2)	0.0074
				Desarrollo pequeño, hojas pequeñas (2)	0.0074

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



De las 75 plántulas regeneradas que presentaban características diferentes al fenotipo silvestre se observó que 31 plántulas tenían morfología diferente en la hoja de las cuales 16 con hoja ancha y nervadura normal, solo 1 con hojas anchas y la nervadura soldada (Cuadro 8). Diferencia en la pigmentación foliar (23 plántulas), 8 plántulas con coloración verde oscuro y nervadura central verde claro, 1 plántula con hojas variegadas y 1 plántula con pigmentación albina (Cuadro 7). En desarrollo diferente 21 plántulas, 9 plántulas presentaban un desarrollo erecto al igual que sus hojas y nervadura hundida y sólo 2 mostraban al igual un desarrollo erecto y al igual que las hojas y con pigmentación verde claro (Cuadro 9).

3.3.5 Determinación de color en las plántulas con diferencia en la pigmentación foliar. La determinación del color de las plántulas se hizo en primera instancia de manera visual y una vez identificadas las plántulas con características diferentes se determinó la coloración de acuerdo al catálogo de color para tejidos vegetales de Munsell (2011) (Cuadro 10).

3.3.6 Tasa de mutación de semillas tratadas en la solución de EMS. De las 480 semillas tratadas en la solución al 20 % durante 20 min, se obtuvieron 260 plántulas de las cuales 12 presentaron un fenotipo diferente en la pigmentación y 6 desarrollo más lento que el testigo (Cuadro 11).



Cuadro 10. Determinación de la pigmentación en la lamina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas al agente químico EMS de acuerdo con las cartas de color de Munsell.

Órgano	Color	Clave (RYGB)
Hoja	Verde claro	5GY 7/8, 6/6
		2.5 GY 8/4, 8/6
		7.5 G 6/2, 7/2
	Verde obscuro	7.5 GY 5/6
		5 BG 7/2
		2.5 B 6/2
	Variegado	7.5 GY 6/10 más 8/8
	Alvina	2.5 GY 8/12

Cuadro 11. Plántulas regeneradas con variaciones de la pigmentación de las hojas y el desarrollo en la plántula y su tasa de mutación.

No. total de semillas	No. de plántulas desarrolladas	No. de plántulas diferentes	Fenotipo	Tasa de mutación ¹	Características del fenotipo
480	260	12	Pigmentación	0.0461	Hojas color verde claro
		6	Desarrollo	0.0230	Entrenudos cortos

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



De las 260 plántulas desarrolladas de semilla se encontraron 12 plántulas con una pigmentación foliar verde claro (5 GY 7/8, Munsell) y 6 plántulas mostraron un desarrollo de entrenudos mas cortos que el fenotipo silvestre (Cuadro 11).

3.3.7 Desarrollo de los segmentos de hoja expuestos al EMS. A partir de 1125 segmentos de hoja que fueron expuestos a la solución 10 % durante 20 min, 341 sobrevivieron (30.31 %), 181 se contaminaron (16.0 %) y 603 no mostraron desarrollo (53.6 %). De los 341 segmentos sobrevivientes 80 regeneraron callo (23.4 %) y 261 no mostraron regeneración (76.5 %). El promedio de brotes por callo fue de 82.1 % de los cuales 36.3 % tuvieron un fenotipo diferente en la pigmentación, morfología y desarrollo al fenotipo silvestre (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto mostrado en el desarrollo de los segmentos de hoja después de ser expuestos en la solución 10 % de EMS durante 20 min.

Número promedio de callo por caja	Diámetro promedio de callo (cm)	Porcentaje de explantes que regeneraron brote	Porcentaje de explantes con fenotipo diferente**
5.2	1.6	82.1	36.3

** Evaluación visual durante la fase *in vitro*.

Luan *et al* (2007) al exponer segmentos de hoja de patata dulce (*Ipomoea batatas* L.) en la solución 0.5 % durante 2 y 2,5 horas lograron regenerar 30 y 32 % de callos viables. En segmentos de hoja de *Lisianthus* expuesto en la solución 10 % durante 20 min se encontró un porcentaje superior de callos viables (82.1 %). Sin



embargo el grado de susceptibilidad puede variar debido probablemente a la especie con la que se trabaja así como el tiempo de exposición al que se somete.

3.3.8 Tasa de mutación de las plántulas regeneradas de segmentos de hoja previamente tratados con la solución de EMS. De los 80 segmentos de hoja se logró la regeneración de 114 plántulas 45 presentaron características diferentes a las del fenotipo silvestre, en relación a la pigmentación de las hojas (Cuadro 13), morfología (Cuadro 14) y al desarrollo de las plántulas (Cuadro 15).



Cuadro 13. Plántulas regeneradas con variaciones en la pigmentación foliar y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.

No. total de explantes	Brotos con explantes	Plántulas regeneradas con pigmentación diferente	Tasa de mutación ¹	Características de la pigmentación foliar	Tasa de mutación
1125	114	22	0.1929	Coloración variegado; obscuro (10 %), claro (90 %) (1)	0.0454
				Coloración verde obscuro (21)	0.1842

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 14. Plántulas regeneradas con variaciones en la morfología y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.

No. total de explantes	Brotos con regeneración	Regeneración de plántulas con diferencia morfológica	Tasa de mutación ¹	Características de la morfología de la hoja	Tasa de mutación
1125	114	7	0.0614	Hoja ancha nervadura normal (5)	0.0438
				Hoja larga, nervadura normal (2)	0.0175

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 15. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación al ser expuestas en la solución al 10 % durante 20 min.

No. total de explantes	Brotos con regeneración	Regeneración de plántulas con desarrollo diferente	Tasa de mutación ¹	Características del desarrollo	Tasa de mutación
1125	114	16	0.1403	Desarrollo pequeño, hojas pequeñas (4)	0.0350
				Desarrollo erecto, hojas erectas (12)	0.1052

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



De las 45 vitroplántulas seleccionadas con diferencias fenotípicas el mayor número de mutantes estuvo en la pigmentación (22 plántulas) de las cuales 21 tenían una coloración verde oscuro y solo 1 con hojas variegadas (Cuadro 13). De las plántulas con desarrollo diferente (16 plántulas) 12 muestran un desarrollo erecto en su estructura y hojas, 4 con desarrollo pequeño en las hojas y estructura (Cuadro 15). El menor número (7 plántulas) de mutantes con morfología diferente fueron de hojas anchas y nervadura normal (5 plántulas) y 2 plántulas con hojas largas y nervadura normal (Cuadro 14).

3.3.9 Determinación de color en plántulas mutantes con fenotipo de pigmentación foliar. La determinación se realizó en dos etapas: la primera etapa fue seleccionando las plántulas con color diferente al testigo de forma visual y en la segunda se determinó la coloración con la ayuda del catálogo de color para tejidos vegetales de Munsell (2011) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Determinación de la pigmentación en la lamina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas al agente químico EMS de acuerdo con las cartas de color de Munsell.

Órgano	Color	Clave (RYGB)
Hoja	Verde oscuro	2.5 G 5/2
	Variegado	5 GY 5/10 más 2.5 GY 8/8

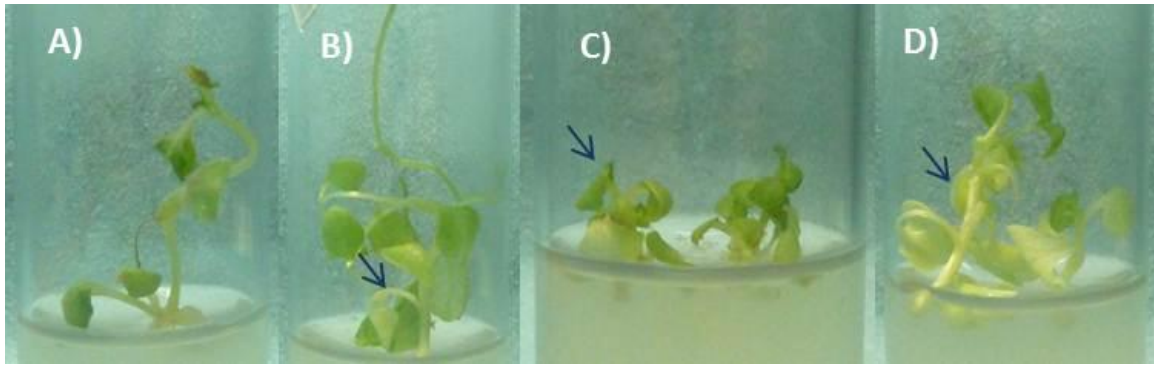


Figura 1. Plántulas mutantes desarrolladas de semillas expuestas a la solución 20 % EMS durante 20 min; A) Testigo, B) Desarrollo, C y D) Pigmentación

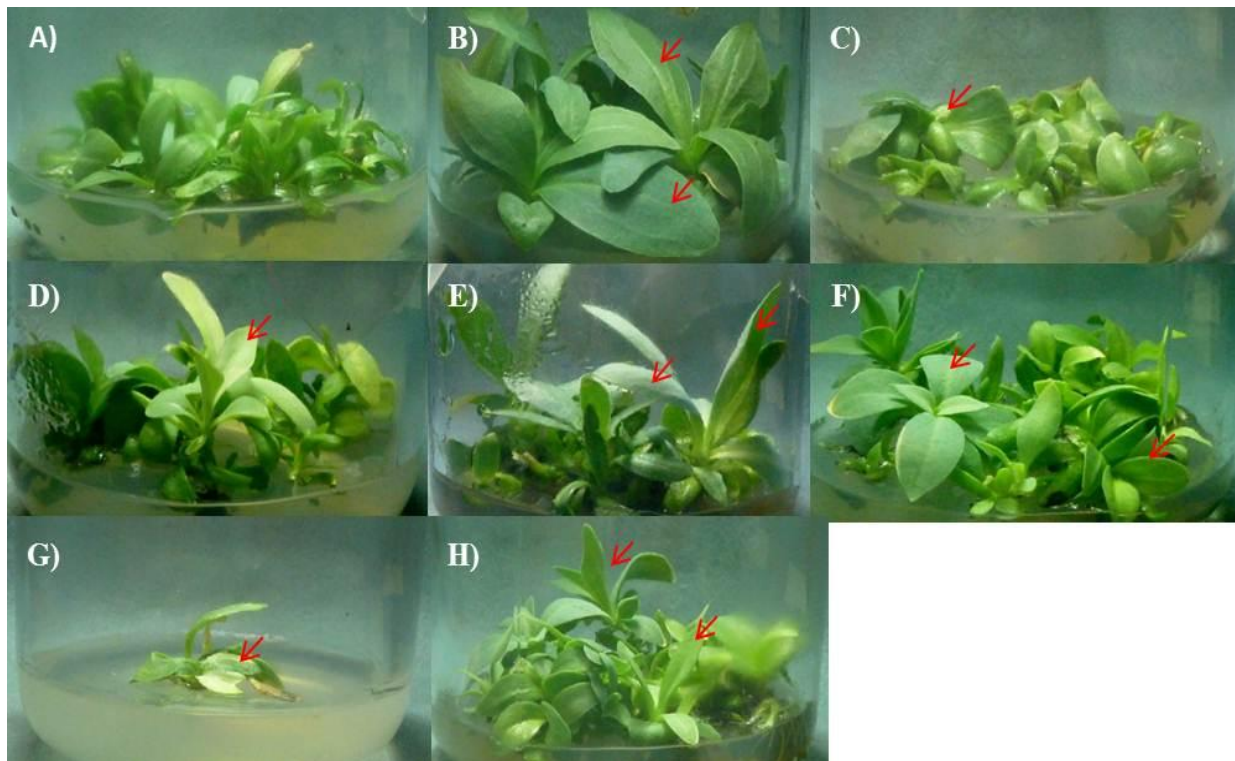


Figura 2. Fenotipo de las vitroplántulas mutantes con las diferentes dosis de EMS: A) Testigo, B) Hoja ancha nervadura abultada, C) Hoja ancha de nervadura soldada, D) Pigmentación verde claro, E) Hojas largas, F) Hojas anchas, G) Pigmentación variegado y H) Fenotipo erecto.

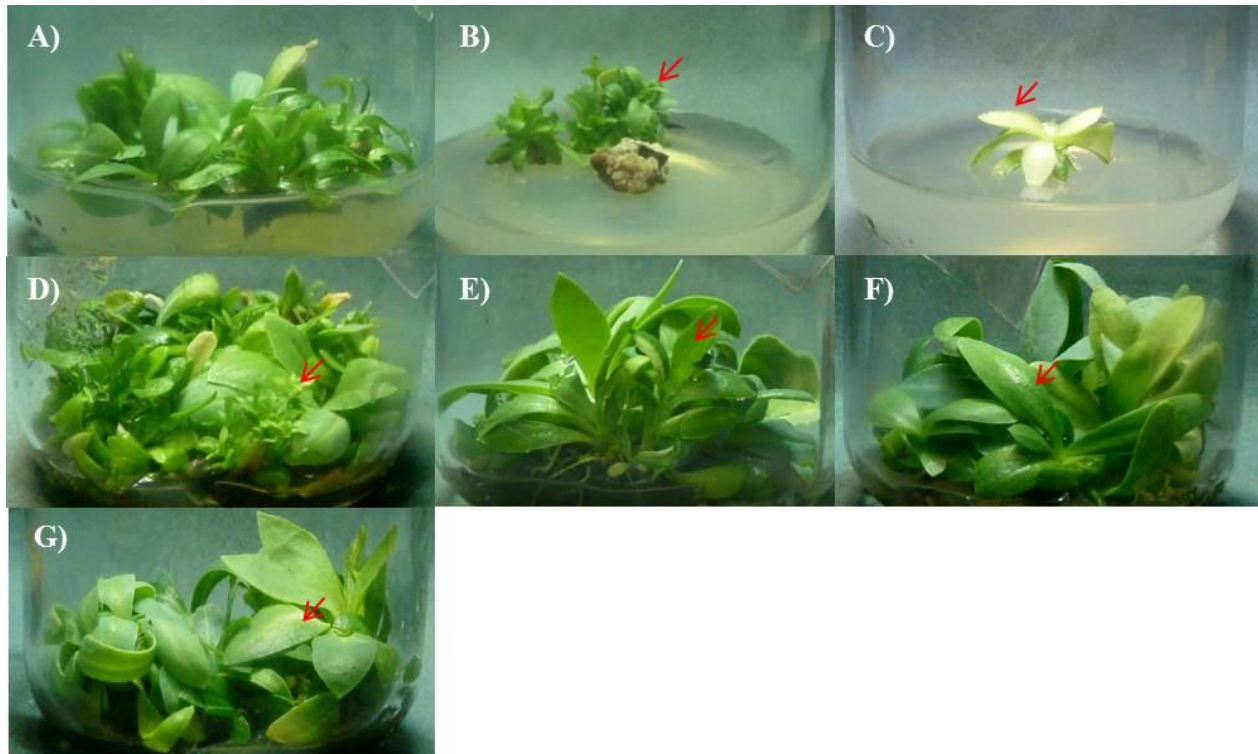


Figura 3. Fenotipo de las vitroplántulas mutantes expuestas en la solución 10 %, 20 min, A) Testigo, B) Hoja pequeñas, C) Pigmentación variegado, D) Desarrollo pequeño, E) Desarrollo erecto hojas erectas, F) Hojas largas y G) Hoja ancha.

3.4 CONCLUSIONES

Las semillas expuestas en la solución 20 % durante 20 min favoreció el desarrollo de plantas con pigmentación verde claro

En base a los resultados obtenidos, la imbibición de segmentos de hoja en EMS es el mejor medio para la regeneración de plántulas de lisianthus. El número de callos se vio favorecido en la solución 10 % durante 20 min. La morfología de las vitroplántulas de



manera general se vio modificada en el tamaño de hojas (anchas y largas) la coloración principal fue verde oscuro y en menor proporción el desarrollo compacto en la arquitectura de planta.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

Aranovich D, E Lewinsohn, M Zaccai (2007) Post-harvest enhancement of aroma in transgenic lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) using the *Clarkia breweri* benzyl alcohol acetyltransferase (*BEAT*) gene. *Postharvest Biology and Technology* 43: 255-260.

Bradley J M, S R Rains, J L Manson, K M Davies (2000) Flower pattern stability in genetically modified lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) under commercial growing conditions. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28: 175-184.

Chandler S F (2003) Commercialization of genetically modified ornamental plants. *Journal Plant Biotech* 5: 69–77.

Chen C, G Wang, Y Qiao, L Zhang (2006) The PLB chemical induced mutagenesis and regeneration of *Phalaenopsis* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* 02.

Cruz-Crespo E, L Arévalo-Galarza, R Cano-Medrano, E A Gaytán-Acuña (2006) Soluciones pulso en la calidad postcosecha de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) cv.'echo blue'. *Agricultura Técnica en México* 32: 191-200.



El-Hamalawi Z A, M E Stanghellini (2005) Disease development on Lisianthus following aerial transmission of *Fusarium avenaceum* by adult shore flies, fungus gnats, and moth flies. Plant Disease 89: 619-623.

Farokhzad A, A Khalighi, Y Mostofi, R Naderi (2005) Role of ethanol in the vase life and ethylene production in cut lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Mariachii. cv. Blue) Flowers. Journal Agriculture Society. Sciences 1: 309-312.

Harbaugh B K, M L Bell, R Liang (2000) Evaluation of forty-seven cultivars of lisianthus as cut flowers. HortTechnology 10: 812-815.

Jamal Uddin A F M, F Hashimoto, M Kaketani, K Shimizu, Y Sakata (2001) Analysis of light and sucrose potencies on petal coloration and pigmentation of lisianthus cultivars (*in vitro*). Scientia Horticulturae 89: 75-84.

Jin W, L Guiru, Y Xueju (2005) Callus Mutation with EMS and Drought-resistant Mutants Selection for Wheat [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin 12; 054.

Kozgar M I, S Goyal, S Khan (2011) EMS induced mutational variability in *Vigna radiata* and *Vigna mungo*. Research Journal of Botany 6: 31-37.

Kozgar M I, S Goyal, S Khan (2011) EMS induced mutational variability in *Vigna radiata* and *Vigna mungo*. Research Journal of Botany, 6(1), 31-37.

Kritzman A, H Beckelman, S Alexandrov, J Cohen, M Lampel, M Zeidan, A Gera (2000) Lisianthus leaf necrosis: a new disease of lisianthus caused by Iris yellow spot virus. Plant Disease 84: 1185-1189.



Kumar V A, R U Kumari, R Amutha, T S Kumar, S J Hepziba, C R A Kumar (2009)

Effect of chemical mutagen on expression of characters in arid legume pulse—cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Research Journal of Agriculture Biological Sciences 5: 1115–1120.

Liu Z, K Zhang, J F Lin, L Q Guo (2011) Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*. Scientia Horticulturae 130: 18-24.

Luan Y S, J Zhang, X R Gao, L J An (2007) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 88: 77-81.

Lugassi-Ben-Hamo M, M Kitron, A Bustan, M Zaccai (2010) Effect of shade regime on flower development, yield and quality in lisianthus. Scientia Horticulturae 124: 248-253.

Markham K R, K G Ryan, K S Gould, G K Rickards (2000) Cell wall sited flavonoids in lisianthus flower petals. Phytochemistry 54: 681-687.

Mumford R A, R Glover, M Daly, T Nixon, V Harju, A Skelton (2008) Iris yellow spot virus (IYSV) infecting lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in the UK: first finding and detection by real-time PCR. Plant Pathology 57: 768-768.

Munsell (2011) Cartas de determinación de color para tejido vegetal.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiologi Plantarum 15: 473-497.



Nalim F A, W H Elmer, R J McGovern, D M Geiser (2009) Multilocus phylogenetic diversity of *Fusarium avenaceum* pathogenic on lisianthus. *Phytopathology* 99: 462-468.

Noda N, Y Kanno, N Kato, K Kazuma, M Suzuki (2004) Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiologia Plantarum* 122: 305-313.

Paek K Y, E J Hahn (2000) Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36: 128-132.

Rezaee F, F Ghanati, M Behmanesh (2013) Antioxidant activity and expression of *catalase* gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum. *South African Journal of Botany* 84: 13-18.

Ricardo M, A Ando (1998) Effects of gamma-radiation and sodium azide on quantitative characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology* 21: 244–251.

Shinner L H (1957) Synopsis of the genus *Eustoma*. *The Southwestern Naturalist* 2: 38-43.

Silva S A, F I F de Carvalho, F L C da Costa, J L M Coimbra, C Lorencetti (1998) Efeito dos mutagênicos asida sódica e metano sulfonato de etila, na geração M₁ em trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Agrociência* 2: 125-129.



Svetleva L (2005) Effect of ethyl methanesulfonate (EMS) and N-nitrose-N-ethyl urea (ENU) on callus growth of common bean. *Journal of Central European Agriculture* 6(1).

Yoshioka Y, R Ohsawa, H Iwata, S Ninomiya, N Fukuta (2006) Quantitative evaluation of petal shape and picotee color pattern in lisianthus by image analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 261-266.

Zaccai M, E Lewinsohn, E Pichersky (2001) Modifying lisianthus traits by genetic engineering. XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part I 552: 137-142.

Zaccai M, N Edri (2002) Floral transition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Scientia horticulturae* 95: 333-340.



CAPITULO IV

IV. Inducción de mutantes en *Eustoma grandiflorum* con radiación gamma Co^{60}

En proceso de publicación en la revista Agrociencia

RESUMEN

Eustoma grandiflorum (lisianthus), es una novedad en la floricultura, donde los fitomejoradores deben innovar debido a las exigencias de los consumidores en los aspectos fenotípicos de las flores y la vida en florero. Los cambios se logran por mejoramiento genético clásico o a través de mutaciones inducidas. Agentes mutagénicos físicos como la radiación gamma de Co^{60} se ha enfocado principalmente a cultivos como cereales (1072 variedades), y con una importante contribución en el mejoramiento de ornamentales (552 variedades), que son plantas óptimas para ser mejoradas mediante esta técnica. El objetivo de este estudio fue inducir mutaciones en *E. grandiflorum* irradiando semillas con dosis de 50 a 500 Gy e intervalos de 50 entre tratamientos y un testigo sin irradiar. Las semillas irradiadas fueron sembradas en cajas petri *in vitro*; los efectos se manifestaron en la germinación y desarrollo de las plántulas de acuerdo con la dosis de radiación expuesta. Se observó la radioestimulación en las dosis de 50 y 100 Gy, la cual propició un aumento de 20 % en la germinación sobre el testigo. El intervalo de dosis de 150 a 450 Gy, favoreció una reducción de 10 % en la germinación y la letalidad total se manifestó en 500 Gy. Las vitroplántulas, provenientes de yemas axilares, fueron expuestas a la radiación con dosis de 0.5 - 100 Gy y posteriormente fueron colocadas en medio nutritivo. La dosis de 36 Gy mostró efectos



benéficos en la regeneración a partir de callo y brote, en tanto que las dosis de 2, 2.5 y 3 Gy tuvieron un efecto promotor de la capacidad regenerativa de brotes.

4.1 INTRODUCCIÓN

E. grandiflorum tiene gran demanda en los mercados florícolas como flor de corte y planta para maceta (Harbaugh, 2006), y se ubica entre los 10 principales cultivos de flor para corte en Europa y Asia, con más de 200 cultivares de flores vistosas y de larga vida postcosecha, producidas principalmente en Japón, Holanda, Italia, Francia y EE. UU. (Harbaugh *et al.*, 2000).

El costo en el mercado de un ramillete de 10 tallos largos en EE.UU. oscila entre 85 y 131 pesos y en México entre 80 y 120 pesos (SNIIM, 2007). Este precio aumenta en las variedades con nuevos fenotipos (formas y colores) debido al pago de regalías, lo que reduce las ganancias de los productores de esta flor en México.

La mutagénesis es una herramienta importante en el mejoramiento de los cultivos libre de las restricciones reglamentarias impuestas a los organismos genéticamente modificados (Parry *et al.*, 2009). En varios países la aplicación de rayos X o gamma a las semillas, constituye el incremento del rendimiento y la calidad de las cosechas (Vasilevski, 2003).

De acuerdo con la base de datos de la FAO/OIEA, de los 465 cultivares liberados de propagación vegetativa, la mayoría se encuentra en la floricultura y pocos en árboles



frutales. En plantas ornamentales como el crisantemo *Dendranthema grandiflora* se generaron plantas mutantes con flores color cobre (Otahola-Gómez *et al.*, 2001) y en *Torenia fourmieri* encontraron diferencias en la arquitectura de la planta (Jala, 2011). Dentro de estas especies están *Alstromeria*, dalia, buganvilia, rosas, *Achimenes*, begonia, clavel, *Streptocarpus* y azalea (Ahloowalia *et al.*, 2001).

Para iniciar una investigación sobre mutagénesis es imprescindible determinar las dosis de radiación que inducen mayor variabilidad y así se ha definido la radiosensibilidad de los tejidos vegetales por la exposición a diferentes intensidades (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010; Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011). La reacción de un tipo de célula dependiera de las condiciones fisiológicas, el tiempo de irradiación y las condiciones pre y post irradiación (Tulmann, 1997).

Con la utilización de la radiación se ha podido obtener una estimulación o inhibición en los tejidos irradiados de diversas especies como se ha reportado en soya (De la Fé *et al.*, 2000), no obstante para el empleo exitoso de la radioestimulación, es necesario un estudio previo de las variedades a emplear para determinar el rango de dosis que produzca una estimulación (Ramírez *et al.*, 2006), por lo cual el presente estudio tuvo como objetivo determinar la dosis de radiación gamma Co^{60} adecuada para inducir mutaciones en plantas provenientes de semillas y vitroplántulas de *E. grandiflorum* con el fin de establecer la curva de radiosensibilidad en semillas e inducir mutaciones en vitroplántulas.



4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal. Se emplearon tres tipos de material de *E. grandiflorum* (lisianthus) color morado: 1) semillas del híbrido F₁ Giseb, 2) secciones de tallo provenientes de plantas producidas en un invernadero comercial y 3) hojas de vitroplántulas regeneradas a partir de yemas axilares de las plantas adultas.

4.2.2 Medios de Cultivo. Se usaron tres medios de cultivo distintos, a) Medio base (MB), con las sales inorgánicas del medio Murashige y Skoog (1962) modificado (comunicación personal Guillermo Carrillo Castañeda) agua de coco (50 mL L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), agar (SIGMA) (6 g L⁻¹); b) Medio MBYH, constituido por el medio MB con 0.12 mg L⁻¹ de 2, 4-Diclorofenoxiacético (2, 4-D) y 1.25 mg L⁻¹ de 6-Benzylaminopurina (6 BAP); y c) Medio MBR, conformado por el medio MB con 1.0 mg L⁻¹ de ácido Indolbutírico (AIB). Todos los medios se prepararon con agua destilada y desionizada y el pH se ajustó a 5.8 con NaOH o HCl 1 N con un potenciómetro marca Sargent-Welch. Los tres medios se esterilizaron en matraces en una autoclave de vapor a 1.05 kg-cm² de presión durante 15 min. El medio MBS se sirvió en cajas *Petri* de plástico de 55 x 15 mm a razón de 7 mL de medio por caja; de los medios MBYH y MBR se sirvieron 20 mL de medio en frascos Gerber de vidrio con capacidad de 122 a 124 mL con tapa de plástico previamente esterilizados.

4.2.3 Desinfección de las yemas axilares. Los segmentos de tallo se lavaron con detergente y agua del grifo y se sumergieron en una solución de alcohol etílico al 70 % v/v durante 30 segundos, posteriormente la solución de alcohol se retiró para un procedimiento de desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % v/v (6 %



de cloro activo) y BacDyn[®] 2 mL⁻¹ (Solución de plata coloidal estable al 0.32 %). En la campana de flujo laminar, la solución desinfectante se retiró para hacer tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

4.2.4 Acondicionamiento del material vegetal antes de la irradiación. Lotes de 25 semillas se colocaron en sobres de papel albanene etiquetados de acuerdo a la dosis correspondiente. Veinte días después de la siembra de las yemas axilares, se tomaron secciones de hoja de 1 cm de largo y 0.5 cm de ancho y callos de 1 cm de diámetro y se cultivaron en cajas *petri* con medio MBYH durante 20 días; una semana antes de la irradiación las vitroplántulas (secciones de hoja y callos) se subcultivaron a medio MBS, con el fin de darle tiempo a los tejidos de recuperarse del daño por el corte.

4.2.5 Irradiación del material vegetal. Se establecieron seis ensayos; un ensayo con semillas y cinco con vitroplántulas y segmentos foliares y callos. La semilla se irradió en un irradiador gamma de Co⁶⁰ LGI-01 marca Transelektro; las vitroplántulas y segmentos de hoja se irradiaron con un irradiador gamma de Co⁶⁰ Gammacell 220, en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Las dosis de irradiación se determinaron con base en la literatura consultada y la experiencia del investigador (comunicación personal Eulogio de la Cruz Torres) (Cuadro 17).



Cuadro 17. Dosis de irradiación con rayos gamma (Co^{60}) para material vegetal de *E. grandiflorum*.

Material Vegetal	Núm. de Experimento	Dosis (Gy)
Semillas	1	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500
	2	0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3
Vitroplántulas, segmentos foliares y de callo	3	1, 2, 3, 4, 5, 6
	4	7, 8, 9, 10, 11, 12
	5	15, 18, 20, 24, 27, 30
	6	36, 40, 45, 50, 55, 60, 100

4.2.6 Cultivo *in vitro* del material irradiado. Después de la irradiación, el material vegetal se trasladó al laboratorio de Genética Molecular dentro del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Donde la semilla peletizada se colocó en una pequeña bolsa de gasa y durante 20 min en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % v/v (6 % de cloro activo) y BacDyn[®] 2 mL⁻¹ (Solución de plata coloidal estable al 0.32 %). En la campana de flujo laminar, la solución desinfectante se retiró para hacer tres enjuagues con agua destilada esterilizada. La semilla fue desinfectada con el procedimiento antes descrito. Posteriormente se cultivaron en medio MBS. Segmentos foliares y de callo al igual que vitroplántulas, fueron cambiados a medio MBYH fresco, para evitar posibles efectos de desnaturalización del medio por efecto de la irradiación. Durante todo el estudio, los cultivo se incubaron a 26 ± 2 °C y humedad relativa 70 – 80 % y 16 horas de luz, 8 de oscuridad.



4.2.7 La radiosensibilidad de la semilla. La radiosensibilidad se evaluó a través del porcentaje de semillas germinadas en cada una de las dosis de irradiación para determinar la DL_{50} . Se hicieron conteos a los 7, 14 y 21 días sobre la germinación, se calcularon los porcentajes y se compararon con el tratamiento testigo (sin irradiar).

Se consideraron tres regiones de radiosensibilidad y una de letalidad:

Región de radioestimulación: valor mayor o igual al control; I

Región de transición: valor menor al control y mayor que la DL_{50} ; II

Región de radioinhibición: valor por debajo de la DL_{50} ; III

Región de letalidad.

4.2.8 Radiosensibilidad de vitroplántulas, callos y secciones de hoja. A los 30 días después de la irradiación se tomaron el porcentaje de sobrevivencia, regeneración de callo, diámetro de callo y regeneración de brotes. Durante la investigación, se hicieron observaciones visuales sobre el fenotipo tomando en cuenta la apariencia, tamaño, pigmentación y morfología de las vitroplántulas. Las diferentes al testigo se subcultivaron en el medio MBR de manera individual para observar si conservaban las características después de la regeneración. Los segmentos de hoja y callo se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por dosis, para semillas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, además para ambos casos se usó como testigo material sin irradiar. Las variables fueron sometidas a un análisis de varianza (ANDEVA) y se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias, esto se realizó usando el paquete estadístico SAS 9.0 (2011).



4.2.9 Determinación de la tasa de mutación. La tasa de mutación se evaluó de acuerdo al número de plántulas mutantes entre el número total de plántulas desarrolladas.

4.2.10 Determinación de color en plántulas mutantes en la pigmentación foliar. La determinación se realizó en dos etapas: la primera etapa fue seleccionaron las plántulas con color diferente al testigo de forma visual y en la segunda se determinó la coloración con la ayuda del catálogo de color para tejidos vegetales de Munsell (2011).



4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Determinación de la DL₅₀ en semillas irradiadas (Co⁶⁰). A los 5 días después de la siembra (DDS), el tratamiento testigo tenía un porcentaje de germinación superior (10 %) a los demás, sin embargo, este porcentaje a los 10 días se observó 30 % debajo de las semillas irradiadas con 50 y 100 Gy (64 y 70 %, respectivamente). Esta diferencia se mantuvo constante durante el tiempo de evaluación. La semilla irradiada con 150 Gy germinó 4 % menos que el tratamiento testigo (Figura 4).

La dosis de irradiación aplicada tuvo un efecto notable en el porcentaje de germinación, al momento de la evaluación a los 5, 10, 15 y 30 DDS, las semillas irradiadas con dosis de 50 y 100 Gy incrementaron 20 % su germinación comparado con el tratamiento testigo, mientras que dosis superiores a 100 Gy mostraron un efecto inhibitorio de 52 % en la germinación. En las semillas irradiadas con 500 Gy no se observaron indicios de germinación.

Las semillas irradiadas con las dosis de 150 a 450 Gy mostraron hasta un 2 % de germinación inferior al tratamiento testigo (55 %). De acuerdo a los datos obtenidos se determinó que la DL₅₀ ± 20 se ubica entre los 100 a 125 Gy para el caso de semillas de *lisianthus*.

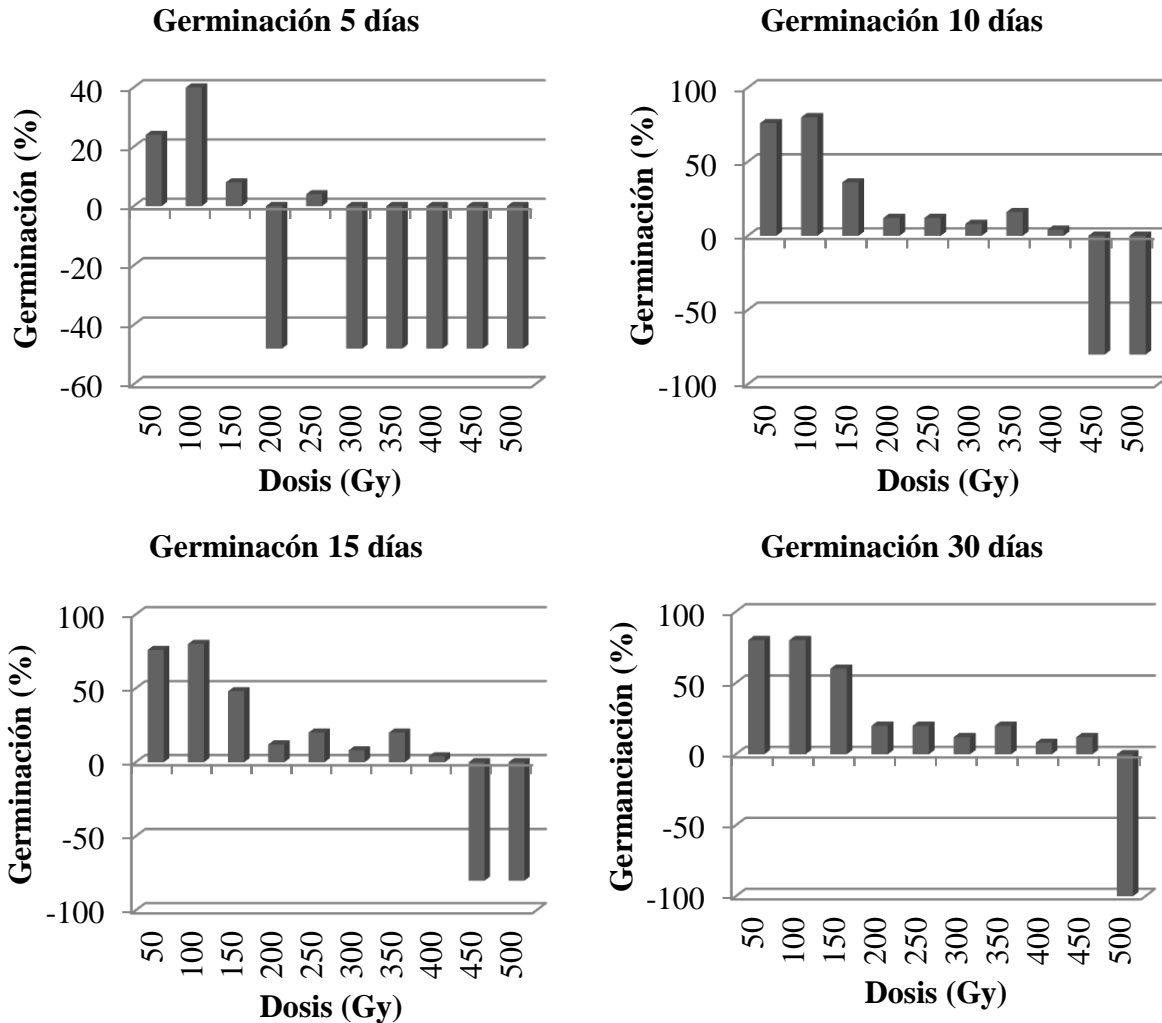


Figura 4. Incremento y/o reducción de la germinación ha los 5, 10, 15 y 30 días después de haberse realizado la siembra.

4.3.2 Efecto en la fisiología de la semilla irradiada. Las dosis de 50 y 100 Gy tuvieron un efecto estimulador en la germinación (64 y 70 %, respectivamente) y se agruparon en el área radioestimulante ya que fue superior al tratamiento testigo con 55 % de semillas germinadas. Las semillas tratadas con dosis de 150 Gy (38 %) mantuvieron un porcentaje de germinación menor que el tratamiento testigo pero no mayor a la DL_{50} (100 a 125 Gy) por lo cual se ubicaron en una región de transición.



Conforme se aumentó la dosis de radiación, la germinación disminuyó, hasta llegar a una región inhibitoria con las dosis de 200 a 450 Gy se alcanzó la letalidad en la dosis de 500 Gy (Cuadro 18 y Figura 5).

Cuadro 18. Agrupamiento de semillas de *E. grandiflorum* según su efecto causado por la irradiación con rayos gamma (Co^{60}) en la germinación.

Agrupamiento	Dosis (Gy)	Germinación (%)	Desarrollo (%)
Testigo	0	55.0 a*	34.7 a
Radioestimulación	50	64.0 a	15.0 bc
	100	70.0 a	24.0 ab
	150	38.0 ab	13.5 bc
Radioinhibición	200	11.0 bc	9.0 bc
	250	14.0 bc	9.0 bc
	300	7.00 bc	4.0 c
	350	14.0 bc	6.0 c
	400	4.00 c	2.0 c
	450	3.00 c	1.0 c
Letalidad	500	0.00 c	0.0 c
DMS		32.4	16.7

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$)

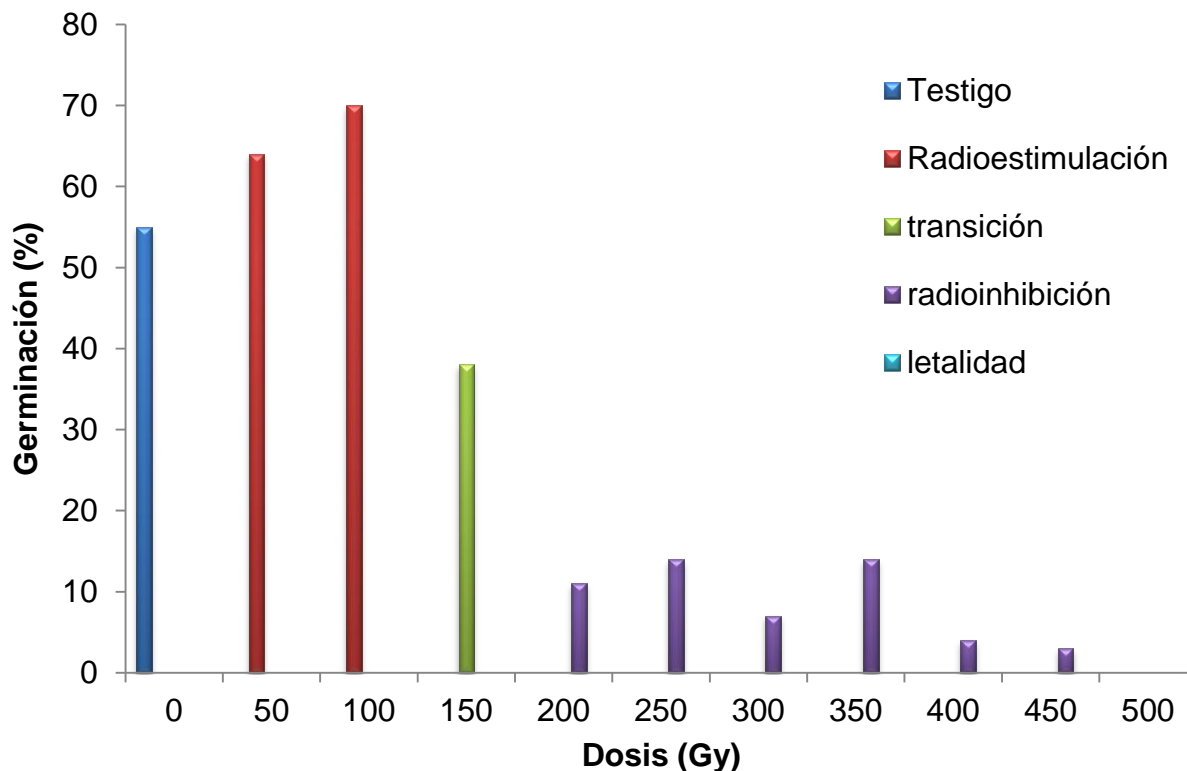


Figura 5. Agrupamiento obtenido por el efecto ocasionado por la radiación gamma (Co^{60}) en la germinación de semillas de *E. grandiflorum*.

Estos valores indican que las semillas de lisianthus tienen una tolerancia baja en comparación con las de otras especies como la soya, que presentan un efecto radioestimulante con dosis de 280 Gy y un efecto inhibitor a partir de 480 Gy (De la Fé , 2000). En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) el porcentaje de germinación comienza a disminuir a partir de dosis de 500 Gy y en el rango de 100 a 400 Gy mantiene 100 % su poder germinativo (Ramírez *et al.*, 2006); en esta especie no observaron efectos de radioestimulación a dosis bajas como sucedió en lisianthus.



Con respecto al efecto de la radiación en función de la especie, variedad, tipo de propágulo y ontogenia del tejido entre otros factores, se tiene datos concerniente a la irradiación en semillas de *Abies religiosa* (Kunth) Schltd, et Cham, en el que se observó una tasa de germinación con efecto radioinhibitorio en la dosis de 20 Gy, y de radioestimulación en la dosis de 5 Gy (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010). Estos resultados hacen evidente la necesidad que se tiene de hacer pruebas dosimétricas previas para una especie, variedad y propágulo en particular para estandarizar un protocolo de irradiación y así obtener el resultado deseado de acuerdo con los objetivos que se planteen.

4.3.3 Efecto de la radiosensibilidad observada en vitroplántulas y explantes.

Las vitroplántulas de *E. grandiflorum* mostraron una gran resistencia a la radiación, sin embargo fueron vulnerables ante la presencia de microorganismos en el medio por lo que varios de los tratamientos fueron eliminados.

Las vitroplántulas irradiadas con las dosis de 2.5 Gy mostraron una estimulación, en promedio generaron más 4.83 callos que el tratamiento testigo (sin irradiar), el cual generó en promedio 3.16 callos. En las plántulas irradiadas con 3.0 Gy redujo el número promedio de callos a 2.33, valor significativamente menor al testigo (3.16 callos). De las dosis 0.5, 1, 1.5 y 2 Gy se obtuvo en promedio un número de callos similar al obtenido en el testigo. La variable diámetro de callo no mostró diferencias estadísticas significativas, sin embargo, se observaron diferencias numéricas en los materiales irradiados con las dosis 0.5 y 1 Gy mayores al tratamientos testigo. Con la dosis 2.5 Gy las vitroplántulas tuvieron en promedio 30 % más brotes regenerados



comparado con el tratamiento testigo; en los tratamientos con 1.5, 2 y 3 Gy también fue observado este efecto estimulante en la brotación con la dosis 1 Gy se redujo la formación de brotes a la mitad. Con las diferentes dosis de radiación aplicadas se indujo cambios en el fenotipo de las plantas. El mayor porcentaje de plántulas con fenotipo diferente (22.3 %) se observó en la dosis 2.5 Gy, seguido por las dosis de 2 Gy (20 %) y 0.5 Gy (18.6 %); en las vitroplántulas irradiadas con un 1 Gy, el número de variantes morfológicas disminuyó a 3.7 % (Cuadro 19).

Cuadro 19. Radiosensibilidad de vitroplántulas de *Eustoma grandiflorum* a la radiación gamma (Co^{60}).

Dosis (Gy)	Número de Callo	Diámetro de callo (cm)	Regeneración (%)	Fenotipo (%)
0	3.16 ab*	1.20 a	36.0 e	0.0 e
0.5	3.50 ab	1.62 a	96.8 a	18.6 b
1.0	3.33 ab	1.58 a	17.3 f	3.7 d
1.5	3.33 ab	1.27 a	90.5 b	10.0 c
2.0	3.83 ab	1.25 a	61.6 c	20.0 b
2.5	4.83 a	1.18 a	96.8 a	22.3 a
3.0	2.33 b	1.23 a	44.6 d	10.1 c
DMS	2.28	0.58	2.94	1.73

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$)

En un segundo experimento los resultados mostraron que las plántulas tratadas con 3 Gy tuvieron el doble de la capacidad de regenerar brotes con respecto al



tratamiento testigo y 25 % de éstos tuvieron diferencias fenotípicas; en las vitroplántulas irradiadas con 2 y 4 Gy el porcentaje de regeneración fue superior al tratamiento testigo solamente en 5 y 8 %, aunque se produjeron 11.5 y 16.6 % de las plántulas con fenotipo diferentes. El menor porcentaje de cambios fenotípicos (5.50 %) se observó en las plántulas irradiadas con una dosis de 1 Gy. En las dosis de 4 y 5 Gy registraron 16 y 17 % de plantas con fenotipos distintos; y estos cambios disminuyeron con dosis menores 2 Gy (11 %) y no se observaron en las plántulas sin irradiar (Cuadro 20).

Cuadro 20. Respuesta de vitroplántulas de *E. grandiflorum* expuestas a radiación gamma Co^{60} .

Dosis (Gy)	Número de Callo	Diámetro de callo (cm)	Regeneración (%)	Fenotipo (%)
0	3.16 a*	1.20 a	36.0 c	0.00 e
1	3.16 a	1.20 a	11.8 d	2.16 d
2	3.50 a	1.27 a	44.1 b	11.5 c
3	3.33 a	1.50 a	77.3 a	25.1 a
4	2.83 a	1.80 a	41.0 b	16.6 b
5	3.66	1.27 a	5.50 e	17.3 b
DMS	2.16	1.01	3.28	1.55

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$)

En los experimentos tres y cuatro se observó una fuerte contaminación por hongos y bacterias, estos microorganismos provenían tal vez del tejido o por la manipulación. La radiación pudo haber generado efectos deletéreos y afectar en las



plántulas los mecanismos naturales de defensa contra microorganismos por tal motivo fueron más vulnerables. La contaminación es un problema común durante la micropropagación, en las diferentes etapas de incubación y manipulación del tejido *in vitro*, ya que los microorganismos utilizan para crecer los macro y micronutrientes que contiene el medio destruyendo los explantes y con ello retrasan su desarrollo al generar modificaciones en el medio que afectan negativamente la sobrevivencia de los explantes. La contaminación puede provenir del tejido vegetal o ser introducida durante la manipulación del tejido (Alcántar y Trejo-Téllez, 2009; Sánchez y Salaverría, 2004).

Debido a esto en los experimentos cuarto y quinto se evaluó el material superviviente que había sido expuesto a las dosis 8 y 18 Gy (la evaluación se realizó por separado). En las variables número y diámetro de callo no existe diferencias estadísticas, sin embargo, numéricamente en la variable diámetro de callo muestra un mayor diámetro en las vitroplántulas irradiadas a 8 Gy (1.5 cm) respecto al testigo. La variable regeneración fue superior en el testigo, mientras que el fenotipo fue mayor con 8 Gy que 18 Gy (Cuadro 21).



Cuadro 21. Efecto de la radiosensibilidad de vitroplántulas de *E. grandiflorum* a la irradiación con rayos gamma (Co^{60}).

Dosis (Gy)	Número de Callo	Diámetro de callo (cm)	Regeneración (%)	Fenotipo (%)
0	3.1 a*	1.2 a	36.0 a	0.1 b
8	4.6 a	1.1 a	30.0 b	8.0 a
18	2.0 a	1.3 a	4.5 b	1.3 a
DMS	4	4	4	4

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$)

En el sexto experimento con dosis elevadas de radiación las vitroplántulas no mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con respecto al número y diámetro de callo. Lo contrario ocurrió para la variable diámetro de callo ya que, la dosis 36 Gy esta por arriba del testigo mientras que las dosis las dosis 45, 50 y 55 Gy se encuentran cercanas al testigo. Referente al porcentaje de regeneración se observaron cinco agrupamientos en donde las plántulas irradiadas con 36 Gy son estadísticamente similares al tratamiento testigo, mientras que con las dosis 45 y 55 Gy las plantas fueron 15 % diferentes con respecto al testigo y bajo estas dosis están 40 y 50 Gy por 5 % (Cuadro 22).

La variabilidad generada en el material irradiado fue fundamental en esta investigación, se encontraron importantes avances, debido a que en dosis bajas existe un porcentaje de diversidad mayor de acuerdo con el aumento en la producción de las vitroplántulas, seguido por dosis altas como lo fueron 36 y 46 Gy.



Cuadro 22. Respuesta morfológica de vitroplántulas de *E. grandiflorum* expuestas a radiación gamma de Co^{60} para determinar la radiosensibilidad.

Dosis (Gy)	Número de Callo	Diámetro de callo (cm)	Regeneración (%)	Fenotipo (%)
0	3.16 a	1.20 a	36.0 a	0.1 e
36	2.75 a	1.40 a	37.1 a	15.0 a
40	2.66 a	1.38 a	5.66 d	1.0 e
45	4.00 a	1.22 a	14.7 b	11.0 b
50	3.25 a	1.22 a	8.00 d	3.0 d
55	4.00 a	1.35 a	11.3 c	7.0 c
DMS	4.11	4.11	4.11	4.11

*Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ($P \leq 0.05$).

4.3.4 Tasa de mutación obtenida de semillas expuestas a radiación gamma (Co^{60}). De las 1800 semillas irradiadas con 100, 125, 150 y 175 Gy, se desarrollaron 340 plántulas, 21 de éstas presentaron características diferentes al tratamiento testigo en el desarrollo, pigmentación y morfología de las hojas (Figura 6) (Cuadro 23).

Cuadro 23. Mutantes obtenidos de semillas de *E. grandiflorum* con radiación gamma (Co^{60}) y su tasa de mutación. Número total de semillas 1800.

No. de plántulas desarrolladas	No. de plántulas diferentes	Fenotipo	Tasa de mutación ¹	Características del fenotipo
340	5	Desarrollo (altura)	0.0147	Porte bajo
	9	Morfología	0.0264	Ápice redondo
	7	Pigmentación	0.0205	Verde claro

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Figura 6. Pigmentación y morfología de plántulas provenientes de semillas irradiadas a dosis de 100 y 125 Gy.

Las plántulas desarrolladas se vieron afectadas principalmente en la morfología de las hojas, 9 plántulas cambiaron en sus hojas de forma de ápice, de pinnado a ápice redondo la pigmentación de estas también se vio afectada, las plántulas (7 plántulas) presentaron una coloración verde claro (2.5 GY 6/10, según Munsell (2011)), un menor número de plántulas (5 plántulas) se vieron afectadas en su desarrollo al ser de crecimiento más lento que el tratamiento testigo (Figura 7).

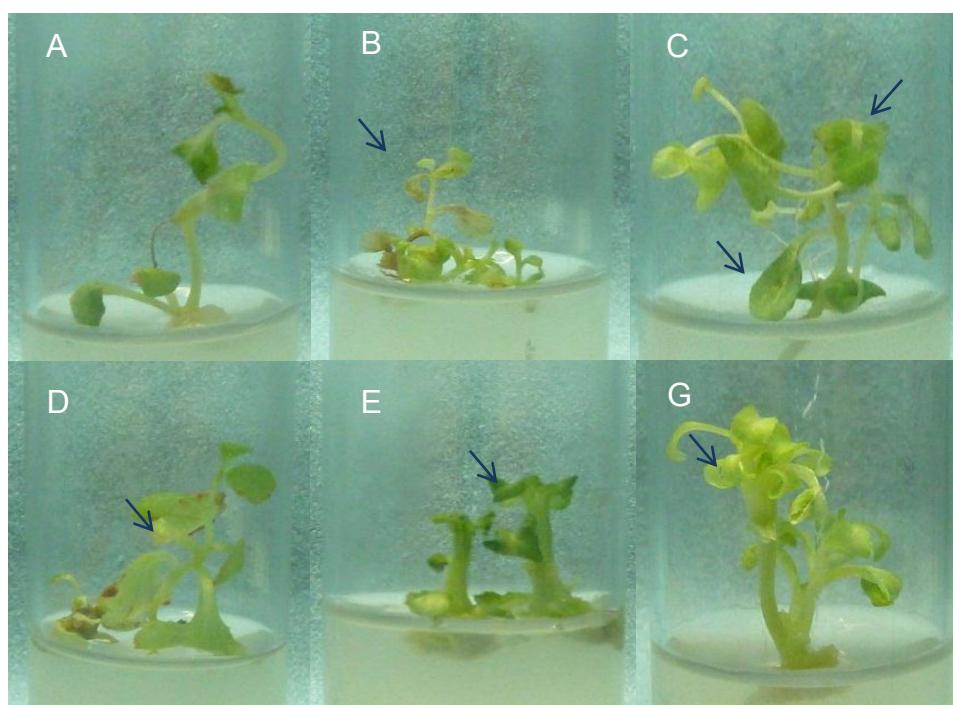


Figura 7. Plántulas mutantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) testigo, B) desarrollo lento, C) hojas redondas, D y G) color verde claro y E) hojas pequeñas.

4.3.5 Tasa de mutación obtenida de vitroplántulas irradiadas (Co^{60}). Se regeneraron 1476 vitroplántulas a partir de 52 vitroplántulas irradiadas, 614 presentaron cambios en color y forma de las hojas, y en su velocidad de desarrollo. Con estas



características se agruparon los mutantes en tres grupos, plántulas con cambios en la pigmentación (Cuadro 24), mutantes con cambios en la morfología (Cuadro 25) y desarrollo (Cuadro 26).

Cuadro 24. Plántulas regeneradas con variaciones en la pigmentación foliar y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).

No. total de explantes	Plántulas			Características	
	Brotos con explantes	regeneradas con pigmentación diferente	Tasa de mutación ¹	de la pigmentación foliar	Tasa de mutación
1476	614	107	0.1742	Verde claro (20)	0.0325
				Verde oscuro (87)	0.1416

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 25. Plántulas regeneradas con variaciones en la morfología y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).

No. total de explantes	Brotos con explantes	Plántulas regeneradas con morfología diferente	Tasa de mutación ¹	Características de la morfología foliar	Tasa de mutación
1476	614	266	0.4332	Hojas largas, ápice pinnado (48)	0.1804
				Hojas largas, ápice ovalado (57)	0.2142
				Hojas anchas (118)	0.1921
				Hojas nervadura central pigmentada (33)	0.1240
				Hojas gruesas (10)	0.0162

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.



Cuadro 26. Plántulas regeneradas con variaciones en el desarrollo y su tasa de mutación al ser expuestas a la radiación gamma (Co^{60}).

No. total de explantes	Brotos con explantes	Plántulas regeneradas con desarrollo diferente	Tasa de mutación ¹	Características del desarrollo foliar	Tasa de mutación
1476	614	241	0.3925	Plántulas erectas y hojas erectas (134)	0.5560
				Plántulas entrenudos cortos (107)	0.4439

1. Número de mutantes entre el número total de plántulas obtenidas.

El mayor número (266) se observó en la morfología de la hoja, de las cuales 118 plántulas mantuvieron el fenotipo de hojas largas, 105 plántulas con hojas largas de éstas 48 tenían el ápice pinnado y 57 ovalado, el menor número (10 plántulas) hojas más gruesas que el testigo. 241 plántulas presentaron fenotipo diferente a la arquitectura del testigo, 114 erectas en estructura y en sus hojas y 107 plántulas con entrenudos cortos. Las plántulas con pigmentación diferente fueron las de menor número (107) de las cuales 87 mostraron hojas verde oscuro y 20 plántulas con hojas verde claro (Figura 8).

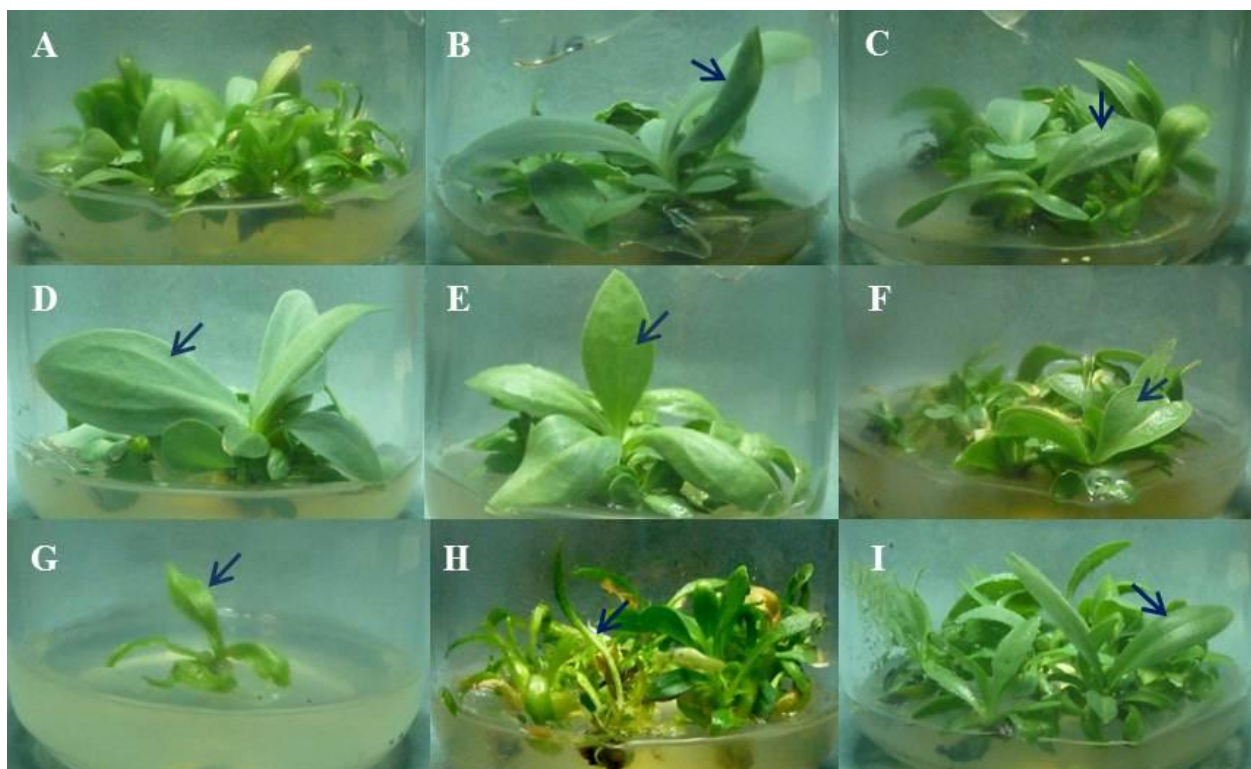


Figura 8. Fenotipo de las vitroplántulas de *E. grandiflorum* mutantes irradiadas (Co^{60})

- A) Testigo, B) Pigmentación verde oscuro, C) Hoja ancha con ápice ovalado, D) Hoja ancha con nervadura prominente, E) Hojas erectas, F) Hoja anchas, G) Hoja ápice pinnado, H) Pigmentación clara e I) Hojas largas y delgadas.



4.3.6 Determinación de color en plántulas mutantes en la pigmentación

foliar. La determinación se realizó con la ayuda del catálogo de color para tejidos vegetales de Munsell (2011) (Cuadro 27).

Cuadro 27. Determinación de la pigmentación en la lámina foliar de vitroplántulas mutantes expuestas a radiación gamma (Co^{60}) de acuerdo a las cartas de color de Munsell.

Órgano	Color	Clave (RYGB)
Hoja	Verde claro	5GY 8/6, 6/6
		2.5 GY 6/10, 8/8
		7.5 G 8/2, 5/4
	Verde oscuro	2.5 G 7/2, 7/4
		5 GY 6/6, 7/4
		5 BG 5/2

4.4 CONCLUSIONES

Para la obtención de un efecto estimulante en la germinación de semillas de *E. grandiflorum*, se sugiere la aplicación de dosis 50 a 100 Gy ya que dosis superiores a los 150 Gy provocaron una disminución en esta variable. Dosis a partir de 100 a 125 Gy en semillas, incrementaron la variabilidad y la obtención de mutantes viables en las plántulas provenientes de semilla.



Se obtuvieron 614 vitroplántulas modificadas principalmente en la morfología de sus hojas, así como plántulas que en su mayoría presentaron la pigmentación verde oscuro.

Se obtuvo un gran número de plántulas con fisiología diferente principalmente en la morfología de las hojas, la arquitectura de la planta (entrenudos cortos), plántulas con pigmentación verde oscuro y otras plántulas pequeñas.

La resistencia que presentan las vitroplántulas de *lisianthus* al ser irradiadas podría ser factor de estudio para establecer la curva de que delimite la DL_{50} .

4.5 LITERATURA CITADA

- Ahloowalia B y S M Maluszynski (2001)** Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173
- Alcántar G G y L Trejo-Téllez (2009)** Nutrición de Cultivos. In: Elementos esenciales. G. G. Alcántar, L. I. Trejo-Téllez, L. P. Fernández, M. de las N. M. Rodríguez. Ediciones Mundi Prensa. Colegio de Postgraduados. México DF, México. 454 p.
- De la Fé C, M Romero, R Ortiz & M Ponce (2000)** Radiosensibilidad de semillas de soya a los rayos gamma 60 Co. *Cultivos Tropicales* 21: 43-47.
- Estrada-Basaldúa J A, M E Pedraza-Santos, E de la Cruz-Torres, A Matínez-Palacios, C Sáenz-Romero, J L Morales-García (2011)** Efectos de rayos



gamma 60 Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 445-458.

Harbaugh B K (2006) Lisianthus, *Eustoma grandiflorum*. In Anderson NO (Ed). Flower Breeding and Genetics. Springer. Netherlands 645–663pp.

Harbaugh B K, M L Bell, & R Liang (2000) Evaluation of forty-seven cultivars of lisianthus as cut flowers. HortTechnology 10: 812-815.

Iglesias-Andreu L G, L R Sánchez-Velásquez, Y Tivo-Fernández, M Luna-Rodríguez, N Flores-Estévez, J C Noa-Carrazana & J L Moreno-Martínez (2010) Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schlttd. et Cham. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente 16: 5-12.

Jala A (2011) Morphological change due to effects of acute gamma ray on wishbone flower (*Torenia fourmieri*) *in vitro*. International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies 2: 101-109.

Munsell (2011) Cartas de determinación de color para tejido vegetal.

Murashige T and F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiologi Plantarum 15: 473-497.

Otahola-Gómez V, M Aray & Y Antoima (2001) Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. Revista Científica UDO Agrícola 1: 56-63.

Parry M A J, P J Madgwick, C Bayon, K Tearall, A Hernández-López, M Baudo, M Rakszegi, W Ja-ada, A Al-Yassin, H Ouabbou, M Labhilili, and A L Phillips (2009) Mutation discovery for crop improvement. Journal Experimental Botany 60: 2817-2825.



Ramírez R, L M Gonzales, Y Camejo, N Zaldivar y Y Fernández (2006) Estudio de radiosensibilidad y selección del rango de dosis estimulantes de rayos X en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Cultivos Tropicales 27: 63-67.

Sánchez-Cuevas M C and J L Salaverría (2004) Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). Revista Científica UDO Agrícola 4: 21-26.

Shibata M (2008) Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. Review. Plant biotechnology 25: 3-8.

SNIIM (Sistema Nacional de Información e integración de Mercados) (2007)

Tulmann N (1997) Mutaciones en el mejoramiento de plantas de propagación sexual. Curso Internacional de Mutaciones Inducidas en el Mejoramiento de las Plantas, Estado Monagas, Venezuela (s/p).

Vasilevski G (2003) Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue 179-186.



CAPITULO V

V. DISCUSIÓN GENERAL

La seguridad también es parte fundamental de la inducción de mutaciones, ya que, los agentes mutagénicos tanto químicos como físicos pueden causar daño no solo al tejido expuesto sino a la persona que los induce por eso es recomendable tener el equipo adecuado para trabajar. La inducción con agentes químicos requiere de un equipo adecuado (mascarilla, lentes, guantes y bata) debido a que el contacto es directo con el producto. La ventaja que presenta el agente físico (rayos gamma Co^{60}) es que al exponer el material vegetal no se está en contacto con la radiación debido a que se coloca dentro de una cámara fabricada de plomo la cual no permite el escape de la radiación.

Semillas de lisianthus

Con la exposición a los agentes mutagénicos se observó que las semillas expuestas a EMS no tuvieron una estimulación en la germinación pues éstas siempre estuvieron por debajo del porcentaje de germinación del testigo. En el caso de las semillas expuestas a rayos gamma (Co^{60}) se pudo observar una dosis de estimulación superando al testigo como una inhibición de la germinación e incluso una muerte total de la semilla. La germinación de las semillas de lisianthus expuestas tanto a EMS como a rayos gamma (Co^{60}) se observó que al incrementarse el tiempo y la dosis de exposición el daño es mayor, esto se notó en los porcentajes de germinación. Para este trabajo las semillas expuestas a los rayos gamma (Co^{60}) a las dosis de 100, 125 y 175 Gy lograron tener una mejor viabilidad al momento de desarrollarse, sin embargo, debido tal vez al daño que pueda ocasionar en la plántula provoca que sea de mayores



cuidados, en este trabajo se lograron obtener mutantes viables con estas dosis. El efecto que causó el EMS en la germinación de la semilla fue aun más notable debido tal vez a que se mantuvo embebida en la solución y el daño ocasionado en el tejido fue mayor, por lo que dicho daño podría haber afectado el desarrollo de las plántulas que lograron germinar, sin embargo los mutantes viables que se lograron obtener fueron mutantes con diferentes niveles de clorosis.

Vitroplántulas de *lisianthus*

Al exponer los tejidos vegetales (hojas, callos y vitroplántulas) a los agentes mutagénicos, se observó diferencias no sólo a nivel fisiológico sino en la forma de multiplicación, ya que, en la división de los tejidos expuestos a rayos gamma (Co^{60}) presentaron una característica muy particular de regeneración pues a estos les salían brotes de las hojas, mientras que en las plántulas expuestas en EMS estos brotes se observaron provenientes de la parte basal. En la pigmentación se observó que los explantes expuestos a EMS regeneraron en su gran mayoría mutantes con diferentes niveles de albinismo, mientras que para los explantes expuestos a rayos gamma (Co^{60}) su coloración predominó más en los tonos verde oscuro, con excepción de los provenientes de dosis altas (50 y 55 Gy) en donde se obtuvieron dos mutantes albinos los cuales no fueron viables. Dentro de la arquitectura de la planta se observó la predominancia de hojas anchas y entrenudos cortos en las vitroplántulas expuestas al EMS, sin embargo se encontraron algunos fenotipos con hojas largas. Caso contrario ocurrió en las vitroplántulas expuestas a rayos gamma (Co^{60}) en donde predominaron las plántulas con hojas largas y fueron pocos los fenotipos observados con hojas anchas. De los tejidos expuestos a EMS se obtuvo un mutante cuyas características



son relevantes a pesar de no ser un material con interés agronómico rentable ya que podría sobrevivir solo *in vitro* pues es de un tamaño pequeño en toda su arquitectura.

Con los dos agentes se lograron obtener mutantes con importante valor agronómico, el cual también dependerá el objetivo buscado. Para los objetivos del presente trabajo en el cual se pretendía encontrar mutantes viables los cuales fueron observados tanto en las vitroplántulas expuestas a EMS como las expuestas a rayos gamma (Co^{60}), ambos métodos fueron eficientes, sin embargo la radiación gamma brinda mayor seguridad para trabajar debido a que no se está en contacto con la fuente de mutación como ocurre con el EMS.



CAPITULO VI

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

Semillas de lisianthus

Al exponer las semillas al EMS se vio favorecido el desarrollo de plantas con pigmentación verde claro en las hojas, característica que puede ser de interés agronómico ya que no se cuenta en el mercado con plantas de lisianthus que presenten esta característica.

De las plantas obtenidas de semillas expuestas a rayos gamma (Co^{60}) se logró tener mutantes que tuvieron un desarrollo pequeño tanto en hojas como entrenudos, así como, diferencias en la morfología y pigmentación de las hojas, las cuales pueden ser importantes ya que no se encuentran plantas con esta características en el mercado.

Vitroplántulas de lisianthus

En las plántulas expuestas a concentraciones de EMS se observó que los mutantes encontrados tienen características con importancia agronómica ya que no se encuentran en el mercado plantas con pigmentación verde claro o en tono verde oscuro con nervadura central verde claro así como plantas de hojas pequeñas y su contraste plantas con hojas anchas.

Las vitroplántulas expuestas a rayos gamma (Co^{60}) también se encontraron mutantes con potencial agronómico ya que una de las principales características observadas fue plantas con hojas largas las cuales se encontraron en posición perpendicular y erecta. Así como también diferencias en la pigmentación de la hoja las



cuales presentaban tonos verde oscuro e incluso azul verde en los cuales se vio que algunas plantas tenían un tono mate y otras eran demasiado brillosas. Estos fenotipos no se han encontrado en el mercado.

De los mutantes seleccionados se logró la regeneración en la cual aun seguían conservando las características por las cuales se seleccionaron esto durante su etapa *in vitro*.

En la etapa de aclimatación algunas plantas seleccionadas como mutantes han conservado sus características mientras que otras retomaron características similares al testigo, se espera que existan diferencias en la forma y color de la flor.

CAPITULO VII.

VII. Bibliografía General

Ahloowalia B S (1998) *In-vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. *In*: S M Jain, D S Brar & B S Ahloowalia (Eds) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 293–309.

Ahloowalia B S, M Maluszynski (2001) Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.

Bárbaro L A, M A Karlanian, D Morisigue (2009) The floating system as an alternative for the production of lisianthus seedlings (*Eustoma grandiflorum* L.). *Agriscientia* 26: 63-69.

Brooks HJ, L F Hough (1958) Vernalization studies with peach embryos. *American Society for Horticultural Science* 71: 95-102.

Chandler S F, F Brugliera (2010) Genetic modification in floriculture. *Biotechnology letters*, 33: 207-214.

Chandler S F, Y Tanaka (2007) Genetic modification in floriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26:169–197.

Clark D G, P Christou, H Klee (2004) Applications of plant biotechnology to ornamental crops. *Handbook of plant biotechnology, vol 2: Applications of Plant Biotechnology in Agriculture, the Pharmaceutical Industry, other industries.* Wiley, London, pp 863–879.

Damiano C, B Ruffoni. E Al. (1989) Tissue culture and micropropagation of *Lisianthus russellianus*, Hook. in *Acta Horticulturae* 251.

- Damiano C, P Currir, P Esposito (1986)** *In vitro* propagation of *Lisianthus russellianus* Hook. Nnalidell Instituto Sperimentale per La Floricoltura Italy 17: 105-113.
- Deroles S C, S E Ledger, R M Miller, K M Davies, N K Given (1993)** Transformation in *Eustoma grandiflorum* (lisianthus). Plant Protoplasts and Genetic Engineering III. Springer Berlin Heidelberg 202-212.
- Deroles S, M Bradley, K Davies, K Schwinn, D Manson (1995)** Generation of novel patterns in lisianthus flowers using an antisense chalcone synthase gene. Ornamental Plant Improvement Classical and Molecular 420: 26-28.
- Domínguez R A (2002)** Cultivo de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 10 pp.
- Granada C L, S J Acuña (2010)** Perspectiva del sector productivo de ornamentales con relación a los derechos de obtentor en México. International Seminar on Plant Breeder's Rights UPOV Convention Two-43 and TWF-41.
- Gutiérrez A M, F R Santacruz, J L P Cabrera, B G Rodríguez (2003)** Mejoramiento genético vegetal *in vitro*, REDALYC, ISSN (Versión en línea): 1665-5745.
- Handa T, S C Deroles (2000)** Transgenic *Eustoma grandiflorum* (Lisianthus). Biotechnology in Agriculture and Forestry 107-122.
- Harbaugh B K (2007)** Flower Breeding and Genetics, Springer 645–663 pp.
- Jain S M, H Häggman (2007)** Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer. 323–333 pp.
- Jiménez (1990)** Producción industrial de plantas en maceta. 1ª Ed. Horticultura. SI Editor. Barcelona, España 427 – 428 pp.
- Klingaman L G (1983)** Potencial new florist crop for Arkansas: Texas blue bell. Arkansas Farm Research 9.

Ledger S E, S C Deroles, D G Manson, J M Bradley, N K Given (1997)

Transformation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Plant Cell Reports 16: 853-858.

Munsell (2011) Cartas de determinación de color para tejido vegetal.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiologi Plantarum 15:473-497.

Nielsen K, S C Deroles, K R Markham, M J Bradley, E Podivinsky, D Manson (2002)

Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. Molecular Breeding 9: 217-229.

Novak F J, H Brunner (1992) Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. IAEA Bull 4: 25-32.

Olvera A F (2004) Evaluación técnica financiera de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Shinn.) para flor de corte bajo invernadero.

Otahola-Gómez V, M Aray, Y Antoima (2001) Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) medianteradiaciones gamma. Revista Científica UDO Agrícola 1: 56-63.

Parry M A J, P J Madgwick, C Bayon, K Tearall, A Hernández-López, M Baudo, M

Rakszegi, W Ja-ada, A Al-Yassin, H Ouabbou, M Labhilili, A L Phillips (2009) Mutation discovery for crop improvement. Journal of Experimental Botany 60: 2817-2825.

Pérgola G, N Oggiano, P Curir (1992) Efects of seeds and seedlings temperatura conditions on planting, boletín and flowering in *Eustoma russellianum*, G. Acta Horticulturae 314: 48-83; 149-158.

- Predieri S (2001)** Induced mutation and tissue culture in fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 185–210.
- Roh M S, R H Lawson (1984)** The lure of lisianthus. *Greenhouse Mgr.* 2:103-104, 108, 110, 112-114, 116-121.
- Santana I, O Nodarse, A Arencibia, A J Rodríguez (1996)** Utilización del α -bromonaftaleno en la inducción de mutaciones en cultivo de tejidos de caña de azúcar, *Boyeros, La Habana, Cuba* 14: 3-14.
- SAS INSTITUTE INC (2011)** SAS/TATTH. U User Guide Release 9.0 Edition. Cary, NC SAS Institute inc. 1028 p.
- Schwinn K E, M Davies, K Deroles, S C Markham, K R Miller, R M Bradley, J M, N K Given (1997)** Expression of an *Antirrhinum majus* *UDP-glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase* transgene alters flavonoid glycosylation and acylation in lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise.). *Plant Science* 125: 53-61.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2012)** Delegación en el Distrito Federal comunicación social. Boletín 012.
- Semeniuk P, R J Griesbach (1987)** *In vitro* propagation of prairie gentian. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 8:249-253.
- Shibata M (2008)** Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. Review. *Plant Biotechnology* 25: 3-8.
- Shinner L H (1957)** Synopsis of the genus *Eustoma*. *The Southwestern Naturalist* 2:38-43.
- Tanaka Y, Y Katsumoto, F Brugliera, J Mason (2005)** Genetic engineering in floriculture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80: 1–24.
- Venning D F (1992)** Flores silvestres. 1º Edición. Editorial Trillas 182-187.

Wood D E, R E Weaver (1982) The genera of *Gentianaceae* in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 63:441-487.

Zaccai M. y N. Edri (2002) Floral transition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Scientia Horticulturae* 95: 333-340.