



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

Inducción de variabilidad en *lisianthus*
(*Eustoma grandiflorum*) mediante mutagénesis
radioinducida

Viviana Berenice García Valderrama

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis: "Inducción de variabilidad en *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)* mediante mutagénesis radioinducida", realizada por la alumna: Viviana Berenice García Valderrama, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

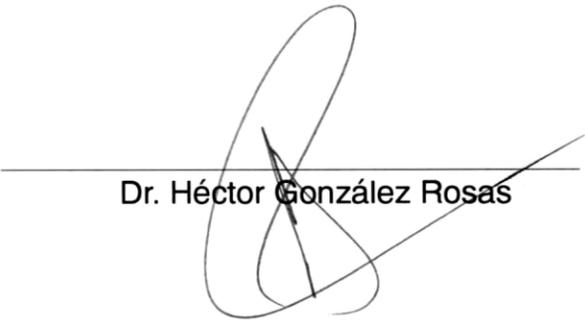
MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

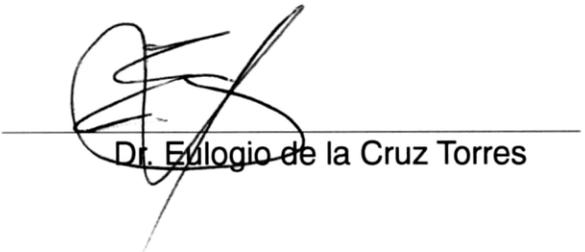
CONSEJO PARTICULAR

Consejero:



Dr. Héctor González Rosas

Asesor:



Dr. Eulogio de la Cruz Torres

Asesor:



M. C. Alejandro Manzo González

Montecillos, Texcoco, Edo. De México, Abril del 2016

AGRADECIMIENTOS

A todos los mexicanos que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me apoyaron durante mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por aceptarme en el Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura.

A mi consejo Particular por brindarme su apoyo, esfuerzo y dedicación durante mi maestría.

Al Doctor Héctor González Rosas, por su amistad, paciencia, apoyo en el proceso y la culminación de mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Doctor Eulogio de la Cruz Torres, por brindarme su amistad y ayuda en todo momento.

Al Maestro en Ciencias Alejandro Manzo González, por su amistad y apoyo.

DEDICATORIA

A mis padres José Luis García Díaz y Graciela Valderrama Arias, por llevarme de la mano hasta alcanzar mis metas, por su apoyo incondicional, por forjarme como la persona que soy actualmente, ha sido un privilegio ser su hija.

A mis hermanos José Luis y Luis Amaury y tío Eduardo García Díaz por compartir momentos inolvidables, apoyándome incondicionalmente, por su amor, sus palabras de aliento y su compañía.

A mis amigas; Fernanda, por ser más que una amiga una hermana incondicional, a Gabriela por ser la primera persona que me abrió su amistad a mi llegada a Colegio y a Samanta por inculcarme más el amor por los animales.

A Canek Mendoza Flores, por ser la persona que me emergió y me llevo de la mano a conocer lo maravilloso de la ciencia e investigación por todos estos años de apoyo, amistad y su amor sincero.

INDICE

	Paginas
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Importancia de las ornamentales.....	4
2.2 Origen del cultivo.....	4
2.3 Generalidades de <i>lisianthus (Eustoma grandiflorum)</i>	5
2.4 Taxonomía.....	5
2.5 Variedades.....	6
2.5.1 Variedades precoces.....	6
2.5.2 Variedades menos precoces.....	6
2.6 Descripción.....	7
2.7 Propagación.....	7
2.8 Etapas de crecimiento.....	8
2.9 Arrosetamiento.....	8
2.10 Requerimientos.....	9
2.10.1 Temperatura.....	9
2.10.2 Luz.....	10
2.10.3 Riego.....	10
2.10.4 Fertilización.....	11
2.11 Mejoramiento genético por mutaciones inducidas.....	11
2.11.1 Agentes mutagénicos.....	13
2.11.2 Agentes físicos.....	13
2.11.2.1 Radiación Ultravioleta.....	14

2.11.2.2 Radiación Gamma.....	14
2.11.2.3 Radiación Beta.....	14
2.11.2.4 Neutrones.....	14
2.11.3 Agentes Químicos.....	14
2.11.3.1 Análogo de bases.....	15
2.11.3.2 Agentes desaminantes o alquilantes.....	15
2.12 Dosis de irradiación.....	16
2.13 Cultivo <i>in vitro</i>	16
2.13.1 Aclimatación.....	17
2.14 Germinación convencional.....	18
2.14.1 Cultivo <i>in vitro</i> de lisianthus (<i>E. grandiflorum</i>).....	19
2.14.2 Germinación <i>in vitro</i> de Lisianthus (<i>E. grandiflorum</i>).....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Ubicación del experimento.....	20
3.2 Material vegetal.....	20
3.3 Medio de cultivo.....	20
3.4 Irradiación del material vegetal.....	21
3.5 Desinfección y siembra de las semillas irradiadas.....	21
3.6 Evaluación de la radiosensibilidad de la semilla.....	23
3.6.1 Evaluación de la sobrevivencia de las semillas germinadas en laboratorio.....	23
3.7 Evaluación del color en las hojas.....	23
3.8 Aclimatación de las plantas obtenidas del cultivo <i>in vitro</i>	23
3.9 Evaluación de altura.....	25
3.10 Evaluación de número de yemas.....	25
3.11 Evaluación del diámetro de la planta.....	25
3.12 Porcentaje de sobrevivencia de plantas en campo.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	26
4.1 Determinación de DL50 para las semillas de lisianthus irradiadas.....	26
4.2 Curvas de radiosensibilidad.....	28
4.3 Porcentaje de sobrevivencia en laboratorio.....	29
4.4 Radiosensibilidad de la semilla irradiada.....	30

4.5 Determinación de color de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	31
4.6 Variantes morfológicos de lisianthus en laboratorio.....	32
4.7 Porcentaje de sobrevivencia en campo.....	35
4.8 Variantes morfológicos de lisianthus en campo.....	36
4.9 Desarrollo de la altura de las plantas en campo.....	38
4.10 Determinación de número de yemas.....	40
4.11 Diámetro de las plantas irradiadas con ⁶⁰ Co.....	42
V. CONCLUSIONES	44
VI. BIBLIOGRAFÍA	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis de radiación en Gy para las semillas de *E. grandiflorum*.

Cuadro 2. Determinación de la pigmentación foliar de las plantas mutantes expuestas a radiación gamma (^{60}Co).

Cuadro 3. Respuesta en la altura de lisianthus expuestas a radiación gamma (^{60}Co).

Cuadro 4. Respuesta en número de yemas en plantas de lisianthus expuestas a radiación gamma (^{60}Co).

Cuadro 5. Respuesta del diámetro en plantas de lisianthus expuestas a radiación gamma (^{60}Co).

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Semillas de lisianthus.
- Figura 2.** Plantas de la variedad mariachi.
- Figura 3.** Lavado de semillas.
- Figura 4.** Siembra de semillas.
- Figura 5.** Tubos de ensayo con semillas.
- Figura 6.** Plantas sumergidas en captan.
- Figura 7.** Trasplante en sustrato.
- Figura 8.** Aclimatación en laboratorio.
- Figura 9.** Aclimatación de plántulas.
- Figura 10.** Aclimatación en invernadero.
- Figura 11.** Porcentajes de la germinación a los 7 días después de la siembra.
- Figura 12.** Porcentajes de la germinación a los 14 días después de la siembra.
- Figura 13.** Porcentajes de la germinación a los 21 días después de la siembra
- Figura 14.** Curva de radiosensibilidad de la semilla de lisianthus.
- Figura 15.** Porcentaje de sobrevivencia de la semilla de lisianthus en laboratorio.
- Figura 16.** Radiosensibilidad de semillas de lisianthus irradiadas con rayos gamma.
- Figura 17.** Determinación de la pigmentación de las plántulas obtenidas *in vitro* de acuerdo al catálogo de color de Munsell (2011).
- Figura 18.** Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) testigo, B) Hojas variegadas, C) Dos plantas de una misma semilla, D) puntas de hojas en tres picos.
- Figura 19.** Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Doble planta de una sola semilla, B) hojas redondas, C) brotes adventicios, D) Hojas acorazonadas.
- Figura 20.** Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes, B) hoja alargadas con un verde claro, C) Hojas redondas con un verde intenso, D) Hojas delgadas y largas.

Figura 21. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Doble planta, B) hoja acorazonadas, C) Hojas variegadas, D) Hojas delgadas y en forma de corazón.

Figura 22. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Tallo y hojas largas, B) Hojas alargadas.

Figura 23. Porcentaje de sobrevivencia de la semilla de *lisianthus* en campo.

Figura 24. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes, B) Hojas alargadas, C) Hojas largas y con brotes, D) Plantas con hojas redondas y largas a la vez.

Figura 25. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas alargadas, B) Hojas redondas, C) Dobles plantas, D) Hojas en forma de corazón.

Figura 26. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes) Hoja redonda con un verde claro, C) Dobles plantas con tallos largos, D) Tallos y hojas largas.

Figura 27. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Planta testigo, B) Plantas con yemas, C) Plantas con hojas largas hacia arriba, D) Plantas con hojas redondas.

INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD EN LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) MEDIANTE MUTAGÉNESIS RADIOINDUCIDA

**Viviana Berenice García Valderrama, MC.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

RESUMEN

Se ha identificado que algunas variaciones en la morfología de la planta y características florales, son prerequisites importantes para la expansión de la industria de las plantas ornamentales, por lo que el desarrollo de nuevos fenotipos de plantas, incluyendo variaciones en la altura, forma, color de flor y hojas, podrían tener impacto económico significativo. La mutación inducida por medio de la radiación, representa una de las principales fuentes de variación, para la creación de nuevas variedades mejoradas. El Lisianthus, (*Eustoma grandiflorum*), posee flores de colores atractivos, con la aplicación de la mutagénesis inducida por rayos gamma con ^{60}Co se pueden obtener nuevas variantes morfológicas, en ésta especie, de utilidad para la industria florícola.

Por lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el grado de variabilidad inducida a través de la irradiación de semillas con gammas de ^{60}Co

La etapa de laboratorio se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo en el Laboratorio de Embriogénesis Somática, Texcoco Estado de México, se irradiaron las semillas, en un rango dosis entre 50-1000Gy con intervalos de 25 Gy entre tratamientos teniéndose un testigo sin irradiar. La irradiación se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y la evaluación del desarrollo de las plantas se llevó a cabo bajo invernadero en la delegación Xochimilco.

Se obtuvieron porcentajes de germinación de más del 90% en las dosis de 75, 125, 175, 400, 450Gray. No se observó germinación en dosis de 950 y 1000Gray. Se determinó que la DL50 está en los 650Gy para el caso de semillas de lisianthus.

La sobrevivencia en laboratorio, después de la germinación superior al 50%, fue para los tratamientos testigo y las dosis de 50 a 500Gy, dosis de 850, 900, 950 y 1000 se obtuvo un 0% de sobrevivencia. Las dosis entre 50 a 450 Gray se agruparon en el área radioestimulante con 85 % de semillas germinadas.

En las plántulas desarrolladas se observaron cambios morfológicos principalmente de las hojas, se obtuvieron plántulas con diferente pigmentación, con variaciones de hojas entre verde oscuro, claro y plantas variegadas.

La mayor sobrevivencia en campo lo obtuvo el testigo con un 92% de sobrevivencia. Se encontró la altura del tratamiento testigo de 10.7cm, y la más bajas entre 700 a 800 (Gray) de 0.8 a 0.7.

Se registró el mayor número de yemas en dosis de 50 y 100 Gray con 14 y 12 yemas respectivamente, en dosis de 550-1000 Gray, no hubo aparición de yemas.

El mayor diámetro se registró en el testigo (dosis sin irradiar), 50, 100 y 125 Gray con 10.7, 10.2, 8.4 y 7.9cm respectivamente.

INDUCTION OF VARIABILITY IN LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) BY RADIATION-INDUCED MUTAGENESIS

Viviana Berenice García Valderrama, MSc.

Colegio de Postgraduados, 2016.

SUMMARY

It has been found that some variations in plant morphology and floral characteristics are important prerequisites for the expansion of the ornamental industry, so that the development of new plant phenotypes, including variations in height, shape, and color of flower and leaves could have a significant economic impact. The mutation induced by radiation represents an important source of variation for the creation of new improved varieties. The Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) has flowers of attractive colors, which if subjected to mutation with Co60 gamma rays new morphological variants can be obtained, proving very useful in the flower industry.

The laboratory work was conducted at the Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo in the somatic embryogenesis Laboratory, Texcoco State of Mexico. Seeds were irradiated with range doses between 50-1000 Gray at intervals of 25 Gray between treatments a control that was not irradiated. Irradiation was performed at the National Institute of Nuclear Research and the evaluation of plant development carried out in Xochimilco.

Germination doses over 90% of 75, 125, 175, 400, 450 Gray were obtained. No germination was observed at doses of 950 to 1000 Gy. It was determined that the LD 50 ± 20 ranks in the 650 Gy in the case of Lisianthus seeds.

Laboratory survival over 50% belonged to the control without irradiation, doses of 50 to 500Gray. Doses of 50 to 450 Gy were grouped in the radiostimulant area with 85 % of germinated seeds.

In developed seedlings morphological changes were observed mainly on their leaves. Seedlings with different pigmentation were obtained which showed dark green, clear green and variegated leaves.

The greatest field survival was obtained by the control with 92% survival. It was found that the greatest height was obtained by the control treatment with 10.7cm, and the lowest were between 700 to 800 (Gy) with 0.8 to 0.7.

The greater number of buds was found at doses of 50 and 100 Gy with 14 and 12 buds respectively. In doses of 550-1000, there was no occurrence of buds.

Finding the largest tillering in the control (non-irradiated dose), 50, 100 and 125 Gy with 10.7, 10.2, 8.4 and 7.9cm respectively.

I. INTRODUCCIÓN

La industria mundial de la flor se nutre de la novedad. Se ha identificado que algunas variaciones en la morfología de la planta, son prerequisites importantes para la expansión de la industria de las plantas ornamentales, por lo que el desarrollo de nuevos fenotipos de plantas, incluyendo variaciones en la altura, forma, el color de flor, el ciclo de floración, el color de las hojas y la resistencia a enfermedades, podrían tener impacto económico significativo (Seneviratne *et al.*, 2007).

Las mutaciones inducidas no introducen material genéticamente modificado ajeno a la planta. Lo único que hace es reorganizar su identidad genética. Además esta técnica no deja radiación residual en la planta (Novak y Brunner, 1992). La principal ventaja de la mutagénesis, es que a partir de una misma población irradiada se pueden obtener genotipos con alteraciones en genes muy diversos debido a su acción aleatoria en el genoma (Pabón, 2011).

El Lisianthus, (*Eustoma grandiflorum*), es una planta originaria del sudoeste de Estados Unidos (Texas, Arizona, Colorado) y del norte de México; pertenece a la familia Gencianácea (CONCYT, 2008). El lisianthus es una especie ornamental poco conocida en México, probablemente porque no se cultiva en grandes extensiones, ya que sólo se reportan en producción, Coahuila, Morelos, Villa Guerrero, Estado de México, Puebla y Guadalajara. Recientemente, esta ornamental está tomando importancia porque es una flor muy atractiva al consumidor por la elegancia y delicadeza de sus flores y por su excelente conservación en florero y maceta (Domínguez, 2008).

En la actualidad, las variedades comerciales de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) que se cultivan en México provienen del extranjero, el costo de producción es alto por el pago de regalías. También existe la necesidad de parte de los productores de contar con variedades generadas en el país y la mutagénesis es un método útil en mejoramiento genético para producir cambios.

El cambio genético que ocurre en las plantas, a través de la mutación, por lo general es aleatorio, puntual y muchas veces perjudicial, pero existe la probabilidad de que ese cambio sea favorable y mejore las características fenotípicas y la capacidad de la planta para crecer, desarrollar y reproducirse en ambientes distintos y contrastantes. La mutación ocurre de forma natural a muy bajas frecuencias y de manera espontánea, pero puede ser inducido a través de un número de agentes, tanto químicos como físicos, llamados mutágenos. De tipo químico son etil metanosulfonato, sulfato de dimetilo y sulfato de dietilo entre otros, por otro lado, los de tipo físico pueden ser rayos x, gamma (Yamaguchi, 2008), ultravioleta, rayos α , β neutrones iones de carbono (Wu, *et al.*, 2009; Matsumura, *et al.*, 2010). La mutación en plantas ornamentales representa una herramienta poderosa (Honda, *et al.*, 2006), para obtener nuevas variantes morfológicas de utilidad para la industria florícola. La mutación inducida por medio de la radiación, representa una de las principales fuentes de variación, para la creación de nuevas variedades mejoradas o para generar genotipos que pueden ser usados como progenitores en programas de mejoramiento, al producir nuevas combinaciones genéticas o incrementar la variabilidad en una población (Rangaiah, 2006). Su uso en la mejora genética y producción agrícola fue desde inicios del siglo pasado con excelentes resultados, en cultivos como maíz, trigo, cebada, algodón y frijol (Canul, *et al.*, 2012).

La inducción de mutaciones es una de las alternativas en los métodos de mejoramiento de plantas, las cuales en combinación con técnicas biotecnológicas como de propagación *in vitro* ofrecen mejores resultados. En experimentos con radiaciones es esencial determinar la dosis letal media (DL50), mediante la evaluación de varias dosis de radiación para comparar la supervivencia y capacidad regenerativa de los explantes cultivados con relación al control. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ayudar a mejorar en forma efectiva la inducción de mutaciones en varios aspectos. Ofrece la posibilidad de elegir el material vegetal para el tratamiento (yemas axilares, órganos, tejidos y células), lo que es más adecuado comparado con un tratamiento *in vivo*, ya que se disminuye el riesgo de obtener quimeras y hay una alta posibilidad de que las células mutadas expresen la mutación en el fenotipo. El cultivo *in vitro* de tejidos

también permite el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variantes seleccionadas. Además, ofrece la posibilidad de realizar en forma rápida los ciclos de propagación con el propósito de separar los sectores mutados de los no mutados del tejido tratado, y permite un control de las condiciones fitosanitarias durante todo el proceso (Pabón, 2011).

Alrededor del 70% de las variedades mutantes del mundo han sido inducidas a través de rayos gamma. Este tipo de irradiación ha permitido generar y liberar 76 nuevas variedades mutantes de diversas especies de plantas ornamentales, con cambios de color y forma de la flor, reducción de clorofila en las hojas para producir follaje variegado (Datta, 2009). La radiación también se ha utilizado para obtener variaciones en el tamaño de la flor, tipo de inflorescencia, forma de la hoja y reducción de tiempo de floración (Hernández, 2013). Por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de diferentes dosis de radiación gamma en Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Evaluar la variabilidad inducida en lisianthus (*E. grandiflorum*) mediante mutagénesis radioinducida.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar *in vitro* el porcentaje de germinación, sobrevivencia, forma y color de hojas de lisianthus, irradiadas con rayos gamma de ^{60}Co .
- Establecer las curvas de radiosensibilidad de lisianthus (*E. grandiflorum*).
- Evaluar en campo sobrevivencia, altura, número de yemas y diámetro de lisianthus (*E. grandiflorum*), irradiadas con rayos gamma de $\text{Co}60$.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de las ornamentales

La producción florícola contiene una amplia variedad de productos. El valor de la producción mundial ha aumentado de 11 mil millones a 60 mil millones de dólares en 2003, (Ruud *et al.*, 2005). La creciente demanda comercial de ornamentales, a nivel nacional e internacional, exige nuevas formas y texturas en este tipo de productos agrícolas que hoy en día son escasas. Por lo tanto, incursionar en la generación de nuevas variedades de ornamentales puede generar una ventaja competitiva en el sector agrícola. En la actualidad, las variedades mejoradas de *Lisianthus* son del extranjero, por lo que existe la necesidad de contar con variedades generadas en el país y la mutagénesis es un método útil en mejoramiento genético para producir cambios heredables (López *et al.*, 2012).

2.2 Origen del cultivo

El *lisianthus* es una planta originaria de las praderas húmedas de la zona meridional de los Estados Unidos y norte de México. Pertenece a la familia de las Gencianáceas su nombre científico es *Eustoma grandiflorum*, esta es una planta de ciclo anual o bianual. Su introducción en Europa y Japón se hizo en los años 30 de este siglo. A través de sucesivos programas de mejora, realizados en su mayoría por empresas japonesas, se han obtenido variedades híbridas F1 de flores blancas, rojas, albaricoque o con mezcla de colores y unas longitudes de 60 a 90 centímetros y con flores sencillas o dobles, estas últimas con dos o tres pétalos (CONCYT, 2008).

2.3 Generalidades de lisianthus

La planta de lisianthus forma una roseta de hojas pecioladas, cordiformes (forma de corazón) y opuestas, cerosas, sobre la que se desarrolla un tallo sin espinas, erecto herbáceo, de color verde azulado y de 0.6 a 0.7 centímetros de diámetro; que puede alcanzar en buenas condiciones 60 a 80 cm. de altura, factor muy apreciado y en cuyo extremo aparecen las flores con pedicelo largo y con un diámetro de 6 a 8 centímetros, es una especie de flores de colores atractivos, y presentan 18 flores por planta, además de durar 15 días luciendo frescas sin generar mal olor en los floreros (CONCYT, 2008).

2.4 Taxonomía

REINO: Plantae

FILO: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Gentianales

FAMILIA: Gencianáceae.

GENERO: Eustoma

ESPECIE: grandiflorum. (CONCYT, 2008).

2.5 Variedades

2.5.1 Variedades precoces

Las variedades precoces son recomendadas para temporadas de días cortos y primaverales, en este grupo se menciona a Heidi, que es una variedad que presenta flores sencillas con, aproximadamente, 10 nudos. Las flores son grandes tipo spray y muy uniformes, existen aproximadamente 14 colores.

Se destaca también la variedad Echo, primera variedad en el mundo que tiene todas sus flores dobles en forma de conos, presenta 10 nudos con tallos muy fuertes, capaces de soportar sus pesadas flores, existen nueve colores separados (Sakata, 2002; Croft y Nelson, 1998; Alvarado, 1997) indica que la variedad Echo es la que presenta un menor porcentaje de arrosamiento y la más alta sobrevivencia al repique y al transplante, en ensayos realizados en Quillota.

2.5.2 Variedades menos precoces

Las variedades menos precoces son recomendadas para temporadas de días largos y alta intensidad lumínica, lo que permite que sus tallos florales sean más largos. Las variedades presentes en este grupo son: Flamenco, la cual es de flor sencilla con 13 nudos, son un poco más grandes que la variedad Heidi, pero más robusta; Mariachi, tiene flores dobles con 13 nudos, la planta presenta un hábito de crecimiento erecto produciendo una gran cantidad de flores de corte muy uniformes; y Balboa que presenta flores dobles, seis colores diferentes y 11-14 semanas entre siembra y cosecha (Paz, 2009).

2.6 Descripción

La planta forma una roseta de hojas pecioladas, cordiformes (forma de corazón) y opuestas, cerosas, sobre la que se desarrolla un tallo sin espinas, erecto herbáceo, de color verde azulado y 0.6 a 0.7 centímetros de diámetro; que puede alcanzar en buenas condiciones 60 a 80 cms. de altura, factor muy apreciado y en cuyo extremo aparecen las flores con pedicelo largo y con un diámetro de 6 a 8 centímetros.

Las flores son tubulosas, bisexuales, cáliz tubular, flores en forma de campanilla; el ciclo de la planta es anual. Las raíces son pivotantes o típicas, lo que es muy importante de estas plantas, que por crecer en áreas semidesérticas llegan a profundidades de 1.25 a 1.40 metros buscando la humedad.

Actualmente se encuentran como cultivares en producción, híbridos trabajados intensamente por fitomejoradores japoneses que han logrado flores de corola regular, rosácea de colores morados, rosados, blanco, amarillos, verde limón, vino tinto, bicolors y de pétalos simples dobles cuádruples (CONCYT, 2008).

2.7 Propagación

La propagación del *lisianthus* es generalmente por semillas, existe la posibilidad de multiplicación mediante esquejes o tejido *in-vitro*. Los esquejes tardan más de dos semanas en enraizar, una vez transplantado, su sobrevivencia es baja

Las semillas son muy pequeñas, por ello es que se comercializan recubiertas (peletizadas) (Shön, 1997). La germinación de la semilla debe presentar los siguientes cuidados en su desarrollo:

a-) La semilla debe sembrarse sin ser cubierta, pues requiere luz roja en forma directa. La germinación normalmente ocurre en 15 días. Sin embargo, en condiciones de germinación *in vitro*, la semilla germina en 6 días y las hojas aparecen después de dos semanas.

b-) La humedad es un factor importante en el momento de la germinación, ya que debe ser suficiente para romper la cápsula de la semilla recubierta. Para evitar deshidratación se debe utilizar un sistema de neblina

c-) Las temperaturas que se deben mantener en el momento de la germinación van entre 21 - 27 °C durante el día y mayor de 18 °C durante la noche.

Las plantas jóvenes crecen muy lentamente formando tan solo 3 a 5 pares de hojas en tres meses, por esta razón es que se debe evitar bajos niveles de luz, porque puede provocar plantas etioladas. En este periodo también se debe controlar la humedad excesiva, ya que ésta es puerta de entrada de enfermedades (CONCYT, 2008).

2.8 Etapas de crecimiento

Una vez plantado el lisianthus, pasa por tres fases:

La primera dura entre veinte y treinta días, y en ella la planta desarrolla sus raíces y muy poco su parte aérea.

La segunda es de aproximadamente 30 días, el tallo se alarga y la planta emite tallos secundarios en número de cuatro a ocho, según la variedad.

Dichos tallos alcanzan alturas de 30 a 50 cm, apareciendo en su extremo los botones florales.

Tercera y última, comprende aproximadamente 30 días. Los botones florales, engrosan y se alargan, sus pedúnculos se elongan hasta alcanzar su altura definitiva. Posteriormente, los botones viran de color verde al propio de la variedad y finalmente abren (Melgares, 2002).

2.9 Arrosetamiento

La roseta es una formación de hojas, sin alargamiento del tallo floral. Sin embargo, se mencionan dos tipos de roseta, la anteriormente definida y la semirroseta, que es una formación compacta de hojas de la cual se produce un alargamiento de un tallo secundario, el que puede llegar a florecer, pero esta flor es de mala calidad.

El arrosetamiento es un factor que limita la producción del lisianthus, éste, puede alcanzar hasta un 90% de las plantas, impidiendo su floración en el periodo aceptable de 140 días y un retraso en la cosecha

Este fenómeno de formar una roseta vegetativa, naturalmente el desarrollo del tallo floral y multiplicar su masa vegetativa, se puede deber, tanto a la sensibilidad a las altas temperaturas, como a las bajas temperaturas en estados inmediatos a la germinación.

Se ha determinado que temperaturas de día, entre los 30 - 35 °C; y nocturnas, de 20 - 25 °C, conllevan con casi absoluta certeza a la formación de las tan temidas rosetas vegetativas. Si aumenta la duración de exposición a altas temperaturas aumenta el porcentaje de plantas arrosetadas. La exposición durante 28 días a 28 °C ocasionó un 96%, 93% y 18% de plantas arrosetadas para el cultivar Yodel White, Yodel Pink y GCREC- azul, respectivamente (Harbaugh *et al.*, 1992).

2.10 Requerimientos

2.10.1 Temperatura

La sensibilidad del lisianthus a las altas temperaturas es elevada en el periodo inmediato después de la germinación de la semilla, época en la que puede inducir a la planta a la formación de una roseta de hojas, que no desarrolle el tallo floral, o que esta floración se retrase mucho.

El lisianthus crece mejor donde las temperaturas mínimas son de 15 °C y las máximas en el día de 25 °C, aunque las plantas resisten temperaturas mayores provocan la formación sistemática de estas rosetas. El roseteo se produce por un manejo inadecuado de la temperatura dentro de la cámara de germinación, y se manifiesta en el campo con una planta que no promueve crecimiento del tallo principal y solo produce hojas.

Esta sensibilidad es muy importante en el periodo que va desde la siembra a la formación del cuarto par de hojas, se considera que si la planta ha formado entre el

quinto y sexto par de hojas, y no ha aparecido el tallo floral, es que ya se ha formado la roseta.

Para evitar la roseta se debe de asegurar que las temperaturas se mantengan en rangos de 23 °C por el día y 18 °C por la noche, hasta la formación del segundo o tercer par de hojas; a partir de ese momento, la sensibilidad de la planta a las altas temperaturas parece disminuir.

Parece que existen otros factores como temperaturas en la época de maduración de la semilla, irradiación, estrés de la planta, sensibilidad varietal etc. que podría también influir en esta formación de rosetas. Este fenómeno es al que mayores esfuerzos e investigaciones se están dedicando, ya que es el que frena el desarrollo de este cultivo durante todo el año.

Por todo ello recomendamos al floricultor que se provea de planta ya germinada y crecida, procedente de semilleros especializados, de donde ya viene formada con cuatro o cinco pares de hojas, y con el tallo floral inducido.

El cultivo debe realizarse siempre en invernadero, descartando su realización al aire libre, ya que de este modo se disminuye la influencia negativa de las inclemencias meteorológicas sobre las plantas (CONCYT, 2008).

2.10.2 Luz

El efecto de foto periodo es mínimo sobre la producción de buena calidad de flores, sin embargo 10 horas diarias son el mínimo aceptable. También la intensidad de la luz debe considerarse, pues plantas vigorosas y con mayor cantidad de flores se producen donde existe más intensidad de la luz natural. 43,000 luxes (lumen/m²) son apropiados (CONCYT, 2008).

2.10.3 Riego

Se recomienda el uso de riego por goteo para reducir agua libre en las hojas y exceso de humedad en el aire. Algunos productores entierran los tubos de riego de 5 a 6 cm

bajo el suelo, para imitar las condiciones naturales del *lisianthus* y promover un sistema de raíces fuerte y profundo. Los riegos deben ser frecuentes y de bajo caudal

El *lisianthus* requiere niveles de humedad más altos en la primera parte de su desarrollo. Cuando las plantas comienzan a madurar y formar botones florales, se deben realizar riegos menos frecuentes (CONCYT, 2008).

2.10.4 Fertilización

El *lisianthus* es muy sensible a cualquier producto químico, por lo cual no deben aplicarse demasiados abonos de lo contrario las plantas sufrirán quemaduras en el sistema radicular y foliar. Realizar una aplicación semanal de fertilizante con Nitrato de calcio, 20-10-20, Nitrato de potasio y Boro, se recomienda al suelo para obtener mejores resultados (CONCYT, 2008).

2.11 Mejoramiento genético por mutaciones inducidas

La mutación inducida se ha aplicado con éxito para la mejora de varios cultivos. Los métodos de inducción de mutaciones más utilizados son las radiaciones ionizantes y las no ionizantes (rayos X, α , β , γ , neutrones, protones y rayos ultravioleta), siendo la radiación gamma la de mayor eficacia en la inducción de mutaciones. También se han utilizado los choques térmicos como inductores de mutación; sin embargo su principal efecto es producir poliploidía y algunas anormalidades fisiológicas. Para que un agente mutagénico sea eficaz se debe tener en cuenta las características del material vegetal como: tipo de tejido, edad y constitución, el ciclo de división (a mayor actividad mitótica mayor sensibilidad a la radiación), número de cromosomas (a mayor número, menor sensibilidad) y el volumen nuclear; además de los factores externos como la temperatura y el contenido de agua (Hernández, 2013).

Se ha identificado que algunas variaciones en la morfología de la planta y características florales nuevas, son prerequisites importantes para la expansión de la industria de plantas ornamentales por lo que el desarrollo de nuevos fenotipos de

plantas, incluyendo variaciones en la altura, el tamaño, la forma, el color de la flor, el ciclo de floración, el color de las hojas y la resistencia a enfermedades, podrían beneficiar ampliamente su proceso de comercialización (Cubero, 2003).

Alrededor del 70% de las variedades mutantes del mundo han sido inducidas a través de rayos gamma. Este tipo de irradiación ha permitido generar y liberar 76 nuevas variedades mutantes de diversas especies de plantas ornamentales, con cambios de color y forma de la flor, reducción de clorofila en las hojas para producir follaje variegado (Datta, 2009). La radiación también se ha utilizado para obtener variaciones en el tamaño de la flor, tipo de inflorescencia, forma de la hoja y reducción de tiempo de floración (Hernández, 2013).

Se han realizado diversos estudios en inducción de mutaciones para obtener nuevas variedades en ornamentales. Por ejemplo, en el crisantemo es una de las especies ornamentales que más se ha expuesto a mutagénesis con el objetivo de inducir variabilidad genética, obteniendo un número considerable de cultivares a través de este método de mejoramiento (Otaola *et al.*, 2001). Por otro lado, en México se están realizando estudios de los efectos de la radiación en nochebuena (Canul *et al.*, 2012) quienes lograron modificar la longitud de bráctea y del pecíolo de la bráctea, además de disminuir la altura de planta.

La mutagénesis inducida es una técnica recién revalidada en el mundo, que, junto con el mejoramiento clásico, puede acelerar de manera considerable el proceso de mejora del cultivo. Representa un proceso a través del cual se generan las mutaciones o los cambios en el material genético. Éstos pueden traducirse en caracteres de interés agronómico, como resistencia a patógenos, tolerancia a estrés hídrico, floración temprana, aumento en el tamaño de la flor, hábito de crecimiento, etc (INTA, 2001).

2.11.1 Agentes mutagénicos

Los agentes mutagénicos son agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN y que provocan mutaciones (radiaciones ionizantes, algunos compuestos químicos).

Es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural. No todas las mutaciones son causadas por mutágenos. Hay "mutaciones espontáneas", llamadas así debido a errores en la reparación y la recombinación del ADN. Los mutágenos son agentes ambientales o químicos que aumentan la tasa natural de mutación (la cual puede ser también clasificada como espontánea o inducida) (Andrews Biology, 2012).

2.11.2 Agentes Físicos

En este grupo encontramos las radiaciones ionizantes, el calor y recientemente se ha mencionado la exposición a campos electromagnéticos de gran potencia.

Los rayos ultravioleta, gamma y X, y las emisiones α y β pueden causar mutaciones, por ejemplo los ultravioleta ocasionan daños moleculares y las radiaciones más fuertes tienden a romper las hebras de ADN. La radiación cósmica y recientemente el Radón se ha encontrado que son mutagenicos.

Las radiaciones pueden alterar la secuencia y estructura del ADN. Son ejemplos la radiación ultravioleta que origina dímeros de pirimidina (generalmente de timina), y la radiación gamma y la alfa que son ionizantes. También se consideran agentes físicos los ultrasonidos, con 400.000 vibraciones por segundo, que han inducido mutaciones en *Drosophila* y en algunas plantas superiores, y centrifugación, que también producen variaciones cromosómicas estructurales (Andrews Biology, 2012).

2.11.2.1 Radiación Ultravioleta

Tiene limitada habilidad de penetración en los tejidos por lo que su uso en experimentos biológicos está restringido al tratamiento de esporas o granos de polen (Pabón, 2011).

2.11.2.2 Radiación Gamma

Cesio137 y Cobalto 60 son las principales fuentes de rayos gamma utilizados en trabajos de radiobiología. El Cesio137 es usado en muchas instalaciones teniendo en cuenta que tiene una vida media más larga que el Cobalto 60 (Pabón, 2011).

2.11.2.3 Radiación Beta

Las partículas Beta (electrones) como de ^{32}P y ^{35}S producen un efecto similar a aquellos rayos X o Gamma, pero con más baja capacidad de penetración (Pabón, 2011).

2.11.2.4 Neutrones

Tienen un amplio rango de energía y son obtenidos de la fisión nuclear en un reactor nuclear con ^{235}U . Los neutrones han mostrado ser muy efectivos en la inducción de mutaciones en plantas (Pabón, 2011).

2.11.3 Agentes Químicos

Son compuestos químicos capaces de alterar las estructuras del ADN de forma brusca, como por ejemplo el ácido nitroso (agente desaminizante), brominas y algunos de sus compuestos. Actualmente hay más de 6 millones de sustancias químicas de ese tipo, de estas 500.000 se utilizan en los procesos de fabricación. En 1977 se creó la International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and

Carcinogens que se dedica a la elaboración de normas de evaluación y de reglamentos sobre el uso y distribución de los agentes químicos mutágenos. Se pueden clasificar según su modo de acción en:

2.11.3.1 Análogo de bases

Son estructuras similares a las bases nitrogenadas, pero contienen modificaciones que aumentan la posibilidad de apareamientos erróneos y tautomerización. Por ejemplo. 5-Bromouracilo (5BU), se incorpora en lugar de timina, pero tiende a cambiar de forma y aparearse con guanina.

La 2-aminopurina (2AP) se comporta como Adenina, pero con frecuencia se tautomeriza y se aparea con la Citosina.

Estos análogos de bases o tautómeros tienen similitud estructural con las bases nitrogenadas, como por ejemplo el 5-bromouracilo o la 2-aminopurina, que se incorporan en el ADN que se replica en lugar de las bases correspondientes timina y adenina. Cuando uno de estos análogos de bases se introducen en el ADN, la replicación ocurre normalmente aunque se pueden producir errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas en la copia de ADN. Es decir, el 5-bromouracilo es un análogo de la timina que contiene bromo en la posición del carbono-5 en lugar del grupo CH₃ que aparece en la timina. La estructura normal (forma ceto) del 5-BU empareja con la adenina; sin embargo, el 5-BU puede cambiar con frecuencia a la forma enol o a una forma ionizada que empareja con la guanina. Ésta en otra replicación se apareará con su correspondiente citosina. Por lo tanto, se ha producido una transición de AT a GC (Andrews Biology, 2012).

2.11.3.2 Agentes desaminantes o alquilantes

Son moléculas que reaccionan directamente con el ADN, el cual no está replicándose, ocasionando cambios químicos en las bases lo que provoca apareamientos incorrectos. Se llama transición si se pasa de una base púrica a otra forma de apareamiento de otra base púrica o de una pirimidina en otra pirimidina; se denomina

transversión si una purina se convierte en una pirimidina. Estos agentes son el ácido nitroso, la hidroxilamina, agentes alquilantes y otros. Los agentes alquilantes, junto con la luz ultravioleta son los agentes mutagénicos más potentes. Los compuestos más conocidos son el etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietil sulfato (DES), etiletanosulfonato, mostaza nitrogenada, etc. Estos químicos modifican los grupos laterales de bases. Esta modificación no es en sí una mutación pero induce errores en la replicación. Por ejemplo metil sulfonato, etilmetano sulfonato, dimetilsulfonato, dimetilsulfato, dietilo sulfato, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, mostaza de nitrógeno, óxido de etileno (Andrews Biology, 2012).

2.12 Dosis de irradiación

La estimación de la dosis más apropiada a aplicar, medida en Gy (Gray), equivalente a 1 J Kg^{-1} , o bien a 100 rad. Es un procedimiento basado en la radiosensibilidad del tejido, la cual es estimada a través de la respuesta fisiológica del material irradiado. Se debe determinar la dosis que causa un 50% de letalidad en el material tratado (DL50) cuando es comparado al testigo en el primer ciclo vegetativo después del tratamiento.

La radiosensibilidad varía con la especie y la variedad, con la condición fisiológica de la planta y órganos y con la manipulación del material irradiado antes y después del tratamiento. Correlaciones entre el estado fisiológico de las plantas y su radiosensibilidad son, a menudo, determinadas por el contenido de agua del tejido (Predieri y Zimmerman 2001).

2.13 Cultivo *in vitro*

Actualmente se acepta que el término cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende a una célula individual, un tejido, o un órgano creciendo en condiciones de asepsia. El cultivo *in vitro* es posible gracias a una propiedad de las células vegetales llamada totipotencia celular, que significa que toda célula vegetal viva con núcleo, es capaz,

sea cual fuere su “especialización” del momento, de reproducir fielmente la planta completa de la cual proviene. Cada célula posee entonces la totalidad del patrimonio genético de la planta. La técnica general consiste en tomar un fragmento de tejido vegetal, colocarlo en un medio nutritivo y provocar (gracias a un equilibrio adecuado de los elementos del medio), directamente o tras manipulación, el desarrollo de una plántula. El conjunto de estas operaciones se desarrolla en condiciones estériles y se seguirá por una aclimatación en medio tradicional (Boutherin y Bron, 1994).

Las distintas técnicas utilizadas se aplican a la resolución de problemas productivos en cultivos de interés comercial y en la elucidación de procesos fisiológicos y bioquímicos en vegetales. En líneas generales, las aplicaciones del cultivo *in vitro*, pueden concentrarse en tres grandes grupos: mejoramiento genético, producción de plantas libres de virus y propagación vegetativa, esto es, micropropagación (Gravina, *et al.*, 1995).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ayudar a mejorar en forma efectiva la inducción de mutaciones en varios aspectos. Ofrece la posibilidad de elegir el material vegetal para el tratamiento (yemas axilares, órganos, tejidos y células), lo que es más adecuado comparado con un tratamiento *in vivo*, ya que se disminuye el riesgo de obtener quimeras y hay una alta posibilidad de que las células mutadas expresen la mutación en el fenotipo. El cultivo *in vitro* de tejidos también permite el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variantes seleccionadas. Además, ofrece la posibilidad de realizar en forma rápida los ciclos de propagación con el propósito de separar los sectores mutados de los no mutados del tejido tratado, y permite un control de las condiciones fitosanitarias durante todo el proceso (Pabón, 2011).

2.13.1 Aclimatación

Es la fase final del proceso, durante la cual las plántulas se preparan gradualmente para el cambio de condiciones ambientales rigurosamente controladas y uniformes del

cultivo *in vitro*, a las extremadamente variables del cultivo en el campo. La calidad final de las plantas *in vitro* depende en parte de su aclimatación. Tras esta delicada fase las plantas se habituarán, progresivamente, al ambiente del invernadero (Boutherin y Bron 1994).

Las dificultades del transplante desde un ambiente *in vitro*, se deben a que bajo estas condiciones, las plantas se mantienen en una atmósfera saturada donde los movimientos de aire son nulos, la luz es artificial y la temperatura es relativamente alta y regular. Existen otras dificultades, como la fuente exógena de carbohidratos metabolizables presentes en el medio de cultivo.

Pero la composición gaseosa dentro de los recipientes de cultivo puede variar inmensamente, dependiendo del tipo de recipiente, del tapado del mismo y del material vegetal. Por otra parte, la atmósfera saturada en humedad, favorece el fenómeno de la vitrificación (Gravina *et al.*, 1995).

2.14 Germinación convencional

El costo de la plántula es relativamente alto, debido a que presenta una germinación no uniforme. La siembra se realiza en charolas plásticas preparando un sustrato con *peat moss* y perlita todo esto debe de ser estéril. 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 arrojamiento, 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; Santos 2013).

2.14.1 Cultivo *in vitro* de lisianthus (*E. grandiflorum*)

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 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 ; Santos 2013).

Damiano y Ruffoni (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 suplementado con ácido giberelico AG3 (1 mg L⁻¹) y carbón vegetal activado.

2.14.2 Germinación *in vitro* de lisianthus (*E. grandiflorum*)

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 debido principalmente a que no ocurre una germinación uniforme lo que dificulta la automatización de la producción de plántulas, aunado a su lento desarrollo.

En condiciones normales de producción la germinación y la emergencia ocurre en un lapso de 10 a 20 días. 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 (Santos, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en dos partes. La primera etapa de la investigación se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo en el Laboratorio de Embriogénesis Somática, Texcoco Estado de México y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. La segunda etapa de la investigación se realizó en Vive Invernaderos, en la Delegación Xochimilco, Distrito Federal, con coordenadas 19°19'-19°09' de latitud norte; y 99°00'-99°09' de longitud oeste

3.2 Material vegetal

La semilla se obtuvo de la empresa Tinajero de la Delegación Xochimilco D.F., se utilizaron 600 semillas de lisianthus *E. grandiflorum* de la variedad Mariachi (Figs. 1-2)



Figura 1. Semillas de lisianthus



Figura 2. Plantas de la variedad mariachi

3.3 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog 1962 (MS), complementado con glicina (2 mg L⁻¹), mio-inositol (100.0 mg L⁻¹), tiamina HCl (0.4 mg L⁻¹), piridoxina HCl (0.5 mg L⁻¹), ácido nicotínico (2.0 mg L⁻¹). El medio de cultivo fue preparado con agua desionizada y ajustado a un pH de 5.7-5.8 con NaOH o HCl 1 N en un potenciómetro.

Se colocó 20 ml del medio en tubos de ensayo de vidrio y posteriormente fueron esterilizados en una autoclave a 1.05 kg/cm² durante 15 min (Murashige y Skoog, 1962).

3.4 Irradiación del material vegetal

Lotes de 25 semillas se colocaron en sobres de papel etiquetados de acuerdo a la dosis correspondiente. La semilla se irradió en un irradiador gamma de ⁶⁰Co modelo LGI-01 marca Transelektro; 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 Eulogio de la Cruz Torres del ININ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Dosis de radiación en Gy para las semillas de *Eustoma grandiflorum*

	Dosis en Gy	
Semillas irradiadas Co60	50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000.	25 semillas por cada dosis de irradiación

3.5 Desinfección y siembra de las semillas irradiadas

Las semillas después de la irradiación fueron llevadas al Laboratorio de embriogénesis somática del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Las semillas, para la desinfección, se colocaron lotes de 25 semillas en un bolsita hecha con un cubrebocas para sumergirlas durante 30 minutos en agua con jabón agitándolas (Figs. 3-4), se enjuagaron con agua corriente, se colocó en etanol al 70% durante 20 segundos y después se enjuago con agua deionizada durante 30 segundos, se pusieron en agitación durante 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 4 %, la solución

se retiró para hacer tres enjuagues con agua desionizada esterilizada. Se sembró una semilla por tubo de ensayo en el medio de cultivo MS mencionado anteriormente (Figs. 5). Se colocaron en el área de incubación, a una temperatura de 26 ± 2 °C con luz constante y 16 horas de luz, 8 de oscuridad



Figura 3. Lavado de semillas

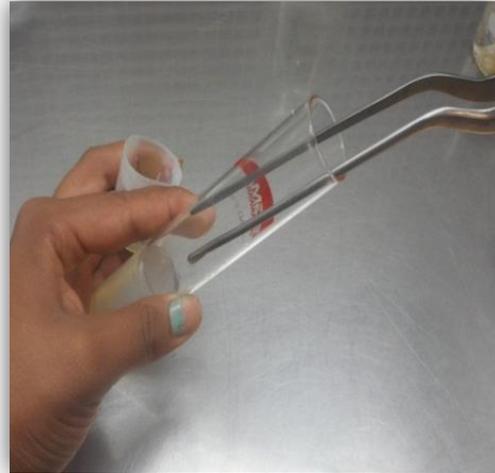


Figura 4. Siembra de semillas



Figura 5. Tubos de ensayo con semillas

3.6 Evaluación de la radiosensibilidad de la semilla

La radiosensibilidad de las semillas irradiadas se evaluó a través del porcentaje de germinación para determinar la DL50. Se hicieron tres conteos a los 7, 14 y 21 días después de la siembra, 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 DL50; II

Región de radioinhibición: valor por debajo de la DL50; III

Región de letalidad (Fé, *et al.*, 2000 y Santos 2013).

3.6.1 Evaluación de la sobrevivencia de las semillas germinadas en laboratorio

Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en laboratorio después en cada una de las dosis de irradiación y el testigo.

3.7 Evaluación del color en las hojas

Se seleccionaron las plántulas con color diferente al testigo de forma visual y se determinó la coloración con la ayuda del catálogo de color para tejidos vegetales de Munsell (2011).

3.8 Aclimatación de las plantas obtenidas del cultivo in vitro

Para la aclimatación de las plántulas obtenidas in vitro se lavaron con agua corriente y se sumergieron en captan para evitar contaminación, se trasplantaron en una mezcla de tepojal y tierra (1:2 partes) previamente esterilizados, se mantuvieron tapados por espacio de dos semanas en laboratorio con riego cada tercer día y posteriormente fueron destapados en forma gradual. Pasado los 20 días de aclimatación se llevaron a

un invernadero con una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$, se regaron cada tercer día y fueron fertilizadas cada quince Figs. 6-10.



Figura 6. Plantas sumergidas en captan



Figura 7. Trasplante en sustrato



Figura 8. Aclimatación en laboratorio



Figura 9. Aclimatación de plántulas



Figura 10. Aclimatación en invernadero

3.9 Evaluación de la altura

Para medir la altura se empleó una cinta métrica, la unidad de medición fue el centímetro y se midió desde la base del tallo hasta la punta del mismo, a los 15, 30 y 45 días.

3.10 Evaluación de número de yemas

El conteo de yemas, fue realizado manualmente contando en cada planta el número total de yemas por cada tratamiento y testigo, a los 15, 30 y 45 días.

3.11 Evaluación del diámetro de la planta

Para obtener el diámetro de la planta, se procedió a medir a los 15, 30 y 45 días, con una cinta y la unidad de medición se expresó en centímetros.

3.12 Porcentaje de sobrevivencia de plantas en campo

Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en campo a los 30, 60 y 90 días, en cada una de las dosis de irradiación y se compararon con el testigo (sin irradiar) después de ser aclimatadas en laboratorio.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de DL50 para las semillas de Lisianthus irradiadas

Se determinó la dosis DL50, que causó un 50% de letalidad en las semillas de lisianthus tratadas con rayos gamma con Co^{60} , comparado al testigo.

En la primera evaluación a los 7 días después de la siembra (DDS), se observó la mayor germinación en dosis de 75, 100 y 50, 125 Gy, con un porcentaje de germinación de 92%, 86%, 80%, 52%, respectivamente. Comparado con el testigo (sin irradiar) con 65% de germinación (Fig.11).

A los 14 días (DDS), aumentó el porcentaje de germinación de más del 80% en dosis de 75, 175, 100, 200, 50, 400, 150, con una germinación del 96%, 96%, 93%, 88%, 85%, 84%, 84%, respectivamente y testigo (sin irradiar) con un 84% de germinación (Fig.12).

En la última y tercera evaluación las dosis de 75, 125, 175, 400, 450, obtuvieron los porcentajes más altos de germinación, siendo estos superiores a 90%, (96%, 96%, 96%, 92 %, 92%, respectivamente). Se obtuvieron porcentajes de germinación de menos de 50% en las dosis de 650, 700, 750, 800, 850, 900 Gy, no se observó germinación en dosis de 950 y 1000 Gy Fig.13.

De acuerdo a los datos anteriores se determinó que la $DL50 \pm 20$ se ubica entre los 650 Gy para el caso de semillas de lisianthus.



Figura 11. Porcentajes de la germinación a los 7 días después de la siembra.

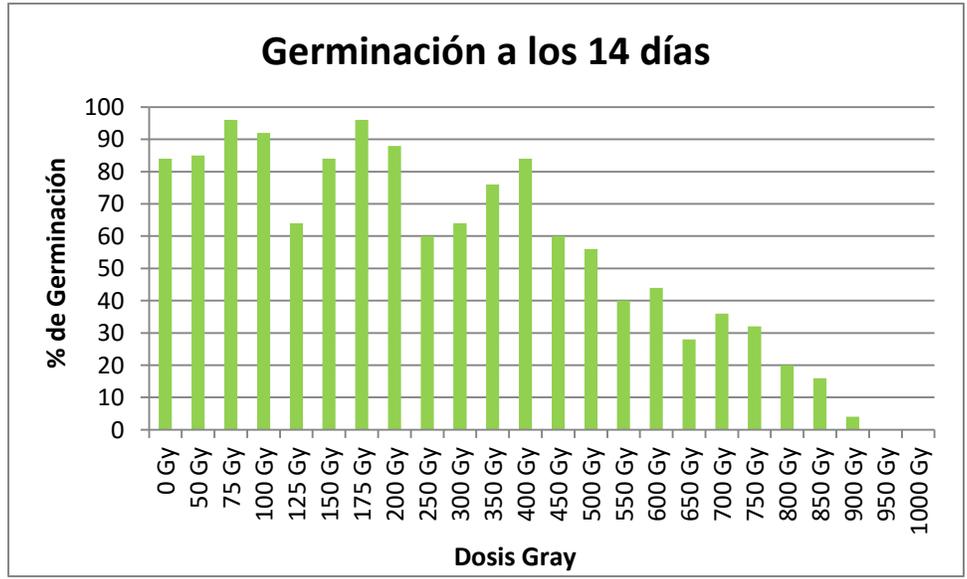


Figura 12. Porcentajes de la germinación a los 14 días después de la siembra.



Figura 13. Porcentajes de la germinación a los 21 días después de la siembra.

4.2 Curva de radiosensibilidad

La germinación se mantuvo constante superior al 80% en testigo y dosis de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 550Gray. Fue declinando en dosis desde 500, 550 y 600 Gy con una germinación menor del 80% pero superior al 50%. En el rango de dosis de 650 a 900Gray, se mantuvo por debajo del 40%. En las dosis de 950 y 1000Gray no hubo indicios de germinación de las semillas (Fig.14)

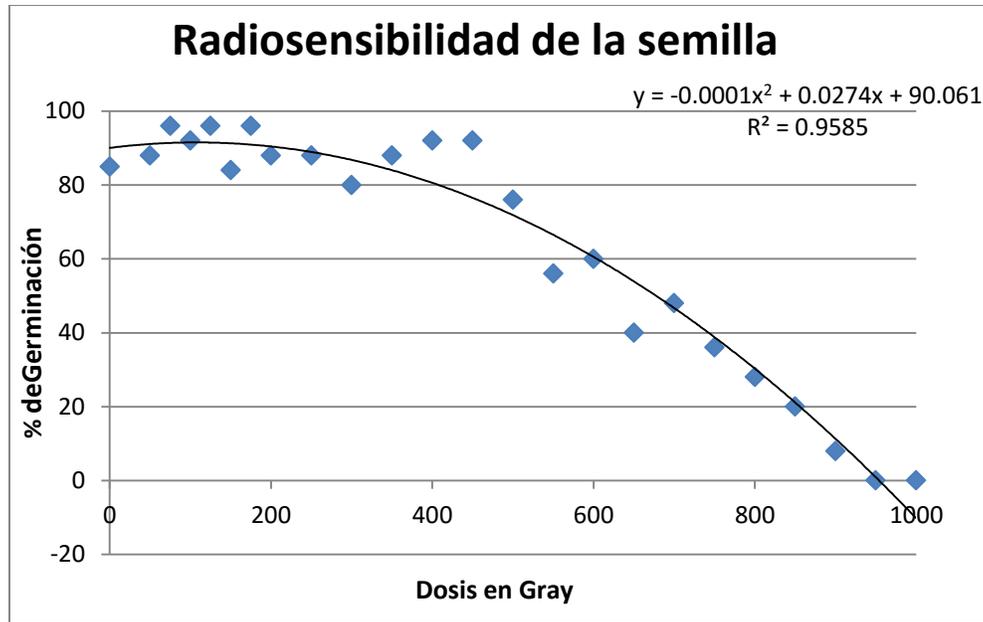


Figura 14. Curva de radiosensibilidad de la semilla de lisianthus

4.3 Porcentaje de sobrevivencia en laboratorio

El testigo además de dosis de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 Gy se mantuvo un porcentaje de sobrevivencia en laboratorio de más del 50%. Dosis de 550, 600, 650, 700, 750 y 800 Gy tuvieron un porcentaje menor del 50% de sobrevivencia y de 850, 900, 950 y 1000 se obtuvo un 0% de sobrevivencia (Fig. 15).

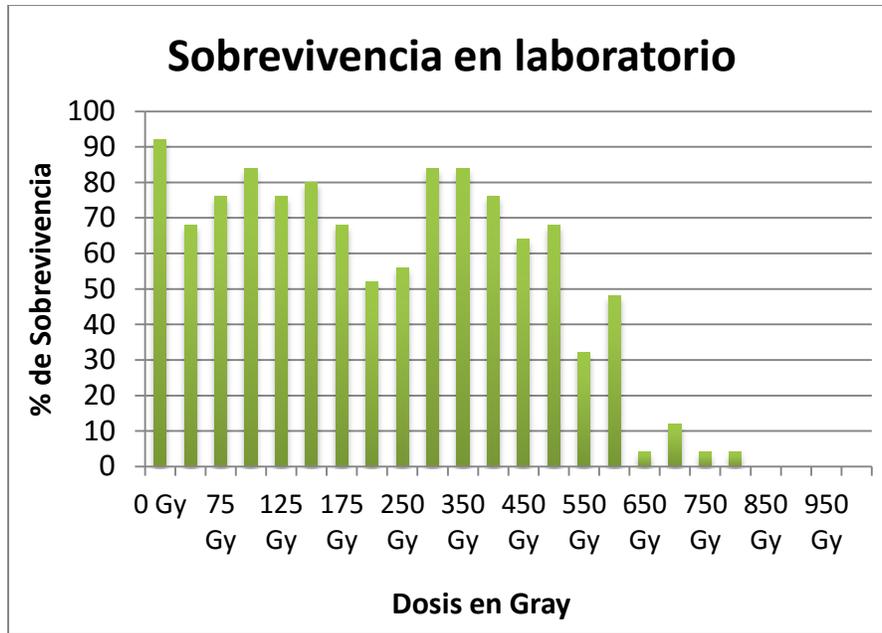


Figura 15. Porcentaje de sobrevivencia de la semilla de lisanthus en laboratorio

4.4 Radiosensibilidad de la semilla irradiada

Las dosis de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 Gy se agruparon en el área radioestimulante ya que fue superior al tratamiento testigo con 85 % de semillas germinadas.

Las semillas tratadas con dosis de 500, 550 y 600 Gy mantuvieron un porcentaje de germinación menor que el tratamiento testigo pero no mayor a la DL50 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 de radioinhibición con las dosis de 650, 700, 750, 800, 850 y 900 Gy. Se alcanzó la letalidad en la dosis de 950 y 1000 Gy (Fig. 16).

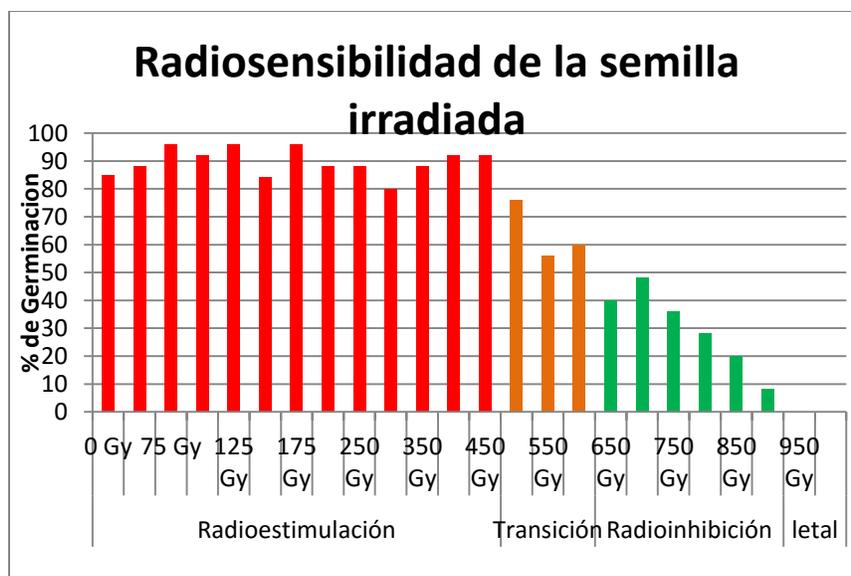


Fig.16. Radiosensibilidad de semillas de lisianthus irradiadas con rayos gamma

4.5 Determinación de color de plántulas obtenidas *in vitro*

Se determinó el color de las plántulas expuestas a la radiación gamma obtenidas *in vitro* de forma visual, identificando aquellas con características diferentes, y después se determinó la coloración de acuerdo al catálogo de color de Munsell (2011) (Cuadro 2, Fig. 17).

Cuadro 2. Determinación de la pigmentación foliar de las plantas variantes obtenidas al ser expuestas a radiación gamma (^{60}Co).

	Color	Clave
Hojas	Verde oscuro	5GY 6/4 5G 6/2, 6/4, 5/2
	Verde claro	5BG 6/4, 6/6 5GY 7/6, 8/6, 7/8, 7/4, 8/4, 6/6.

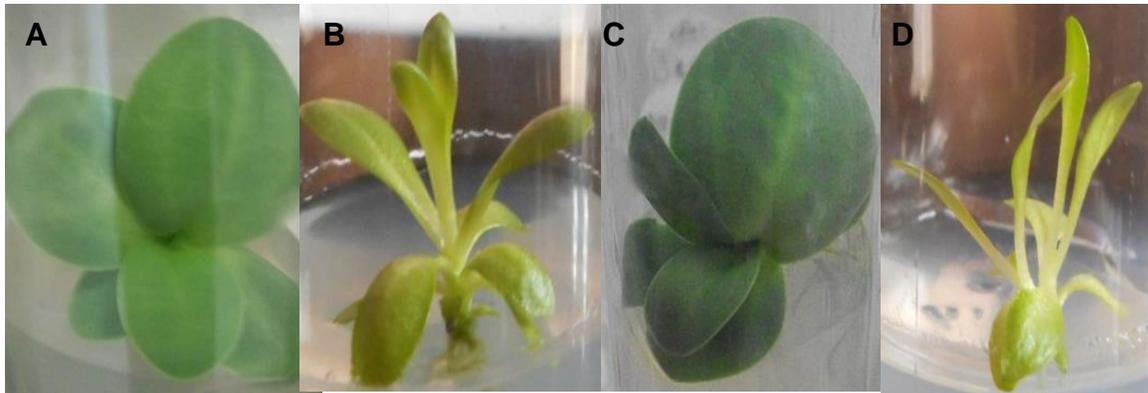


Figura 17. Determinación de la pigmentación de las plántulas obtenidas in vitro de acuerdo al catálogo de color de Munsell (2011)

4.6 Variantes morfológicas de lisianthus en laboratorio

Se observaron mutantes obtenidos de semillas de *E. grandiflorum* al ser irradiadas con rayos gamma (^{60}Co) Fig. (18-22).

Las plántulas desarrolladas se vieron afectadas principalmente en la morfología de las hojas, de las cuales tuvieron el fenotipo de hojas largas, delgadas, algunas erectas, puntas de las hojas deformes, dos plantas de una sola semilla, hojas redondas, pequeñas, hojas en forma de corazón, ápices largos. Un menor número de plántulas se vieron afectadas en su desarrollo al ser de crecimiento más lento que el testigo (sin irradiar). Se obtuvieron plántulas con diferente pigmentación de las cuales mostraron hojas verde oscuro, plántulas con hojas verde claro y plantas variegadas.

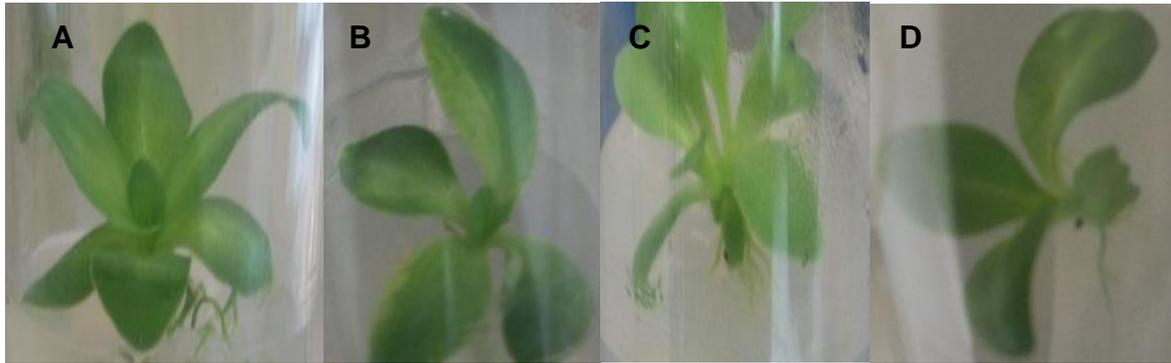


Figura 18. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) testigo, B) Hojas variegadas, C) Dos plantas de una misma semilla, D) puntas de hojas en tres picos

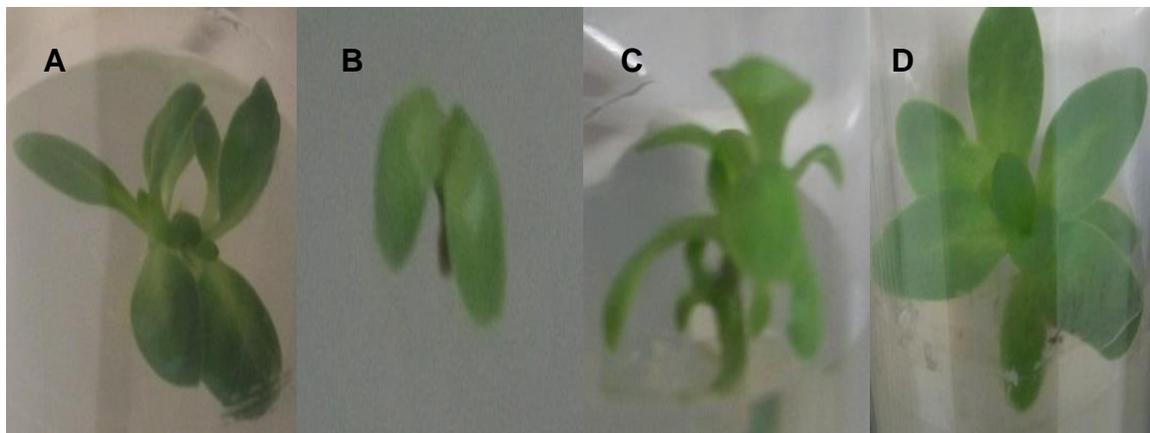


Figura 19. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Doble planta de una sola semilla, B) hojas redondas, C) brotes adventicios, D) Hojas acorazonadas.

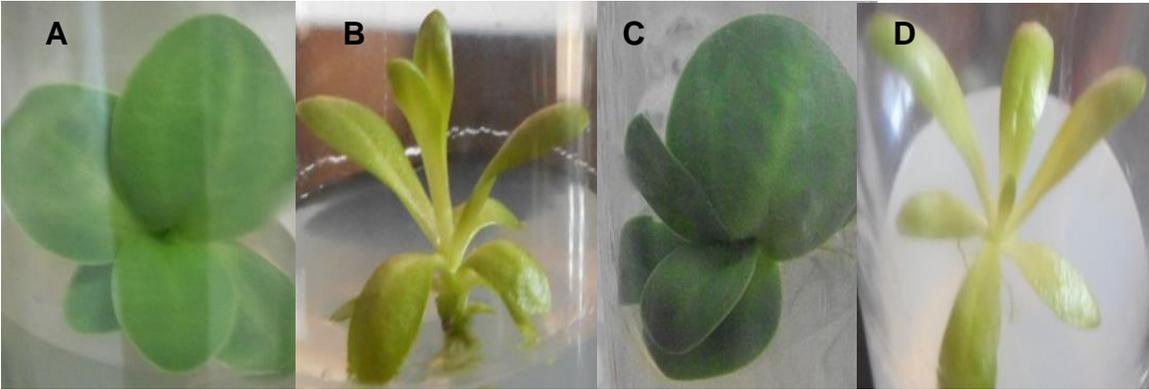


Figura 20. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes, B) hoja alargadas con un verde claro, C) Hojas redondas con un verde intenso, D) Hojas delgadas y largas



Figura 21. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Doble planta, B) hoja acorazonadas, C) Hojas variegadas, D) Hojas delgadas y en forma de corazón.

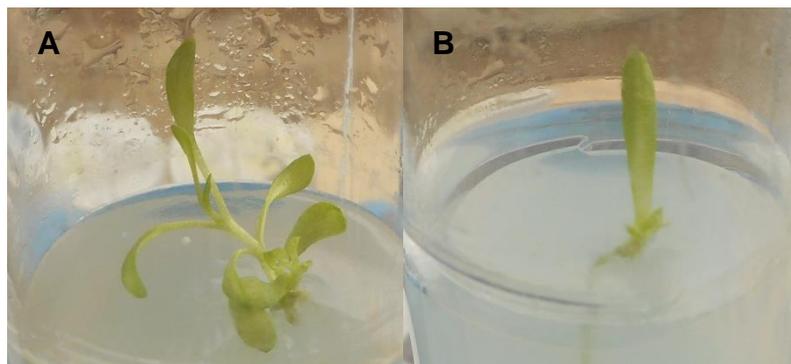


Figura 22. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Tallo y hojas largas, B) Hojas alargadas.

4.7 Porcentaje de sobrevivencia en campo

La mayor sobrevivencia en campo lo obtuvo el testigo con un 92% de sobrevivencia, seguido por la dosis de 300 Gy con un 80%. Obtuvimos un rango de sobrevivencia del mas de 50% pero menos del 80% en dosis de 75, 100, 125, 150, 175, 350, 400, 450, 500 Gy. Por debajo del 50% de sobrevivencia encontramos las dosis de 50, 200, 250, 550, 600, 650, 700, 750 y 800 Gy. En las dosis de 800, 850, 950, y 1000 Gy no se observó sobrevivencia (Fig. 23).

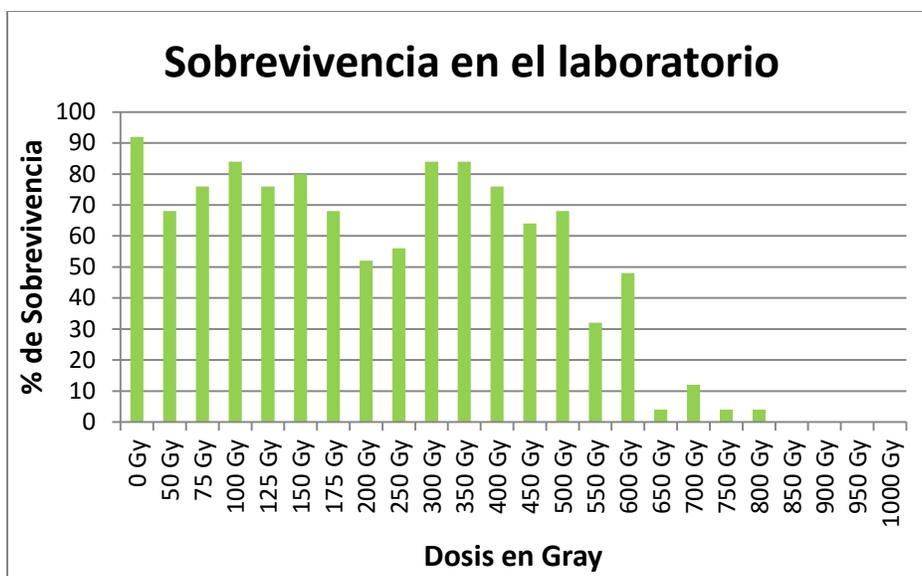


Figura 23. Porcentaje de sobrevivencia de la semilla de lisianthus en campo

4.8 Variantes morfológicas de lisianthus en campo

Se observaron mutantes obtenidos de semillas de *E. grandiflorum* al ser irradiadas con rayos gamma (^{60}Co) (Fig. 24-27). En el invernadero se observaron plántulas desarrollas durante 4 meses. Se observaron variaciones en las hojas, en una misma planta se observaron hojas grandes redondas y al mismo tiempo largas y delgadas, lo que se atribuye a efectos fisiológicos de la radiación. Algunas plantas exhibieron además de hojas largas y delgadas, algunas erectas, con puntas de las hojas deformes. Destaca la presencia de la emergencia de dos plantas de una sola semilla, hojas redondas, pequeñas, hojas en forma de corazón, ápices largos. Un menor número de plántulas se vieron afectadas en su desarrollo al ser de crecimiento más lento que el testigo. Se obtuvieron plántulas con diferente pigmentación de las cuales mostraron hojas verde oscuro, plántulas con hojas verde claro y plantas variegadas.



Figura 24. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes, B) Hojas alargadas, C) Hojas largas y con brotes, D) Plantas con hojas redondas y largas a la vez.



Figura 25. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas alargadas, B) Hojas redondas, C) Dobles plantas, D) Hojas en forma de corazón



Figura 26. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Hojas redondas y grandes) Hoja redonda con un verde claro, C) Dobles plantas con tallos largos, D) Tallos y hojas largas.

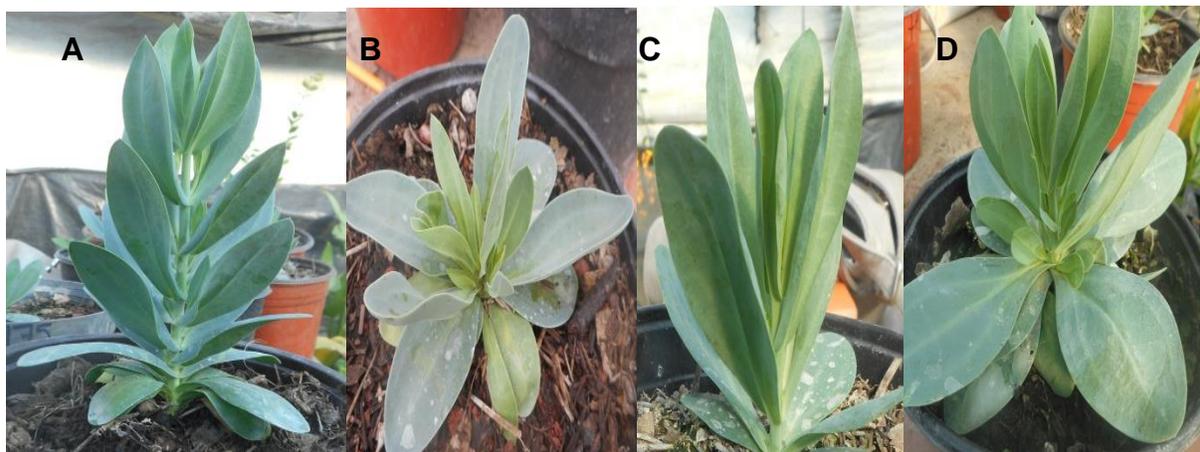


Figura 27. Plántulas variantes *in vitro* provenientes de semillas irradiadas: A) Planta testigo, B) Plantas con yemas, C) Plantas con hojas largas hacia arriba, D) Plantas con hojas redondas.

4.9 Desarrollo de la altura de las plantas en campo

Se realizaron 3 mediciones de las plantas de *lisianthus* en campo, a los 30, 60 y 90 días después de ser llevadas a campo.

La prueba de comparación de medias para la variable altura de planta exhibió diferencia estadística significativa en 9 grupos de tratamientos. El primer grupo incluyó al testigo y la dosis de 50 Gray, con una altura superior a los 12 cm, el segundo grupo incluye a los tratamientos entre 75 y 150 Gray con una altura entre 7.1 y 9.4, el tercer grupo incluyó los tratamientos 125 y 200 Gray con una altura de 8.9 y 8.6, el cuarto grupo incluyó los tratamientos 75, 175 Gray, con una altura entre 7.1 y 7.8, en el quinto grupo el tratamiento de 300 Gray con una altura de 5.3, el sexto grupo incluye los tratamientos 300 y 400 Gray, con una altura de 3.3 y 3.2, en el séptimo grupo incluyó a las dosis 350 y 450 Gray, con una altura 3.37 y 3.22, en el octavo grupo incluyó dosis de 250, 400, 500 Gray, y los tratamientos entre 550 y 800 Gray exhibieron la menor altura con valores entre 1.20 y 0.7 cm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Respuesta en la altura de *lisianthus* expuestas a radiación gamma (Co60)

Tratamientos	Altura	
TESTIGO	12.61	a
50	12.36	a
75	7.19	bd
100	9.49	b
125	8.90	bc
150	9.41	b
175	7.80	d
200	8.60	c
250	2.22	g
300	5.30	e
350	3.37	f
400	1.80	gh
450	3.22	f
500	1.82	gh
550	1.22	ih
600	1.00	i
650	1.30	ih
700	0.85	i
750	0.80	i
800	0.70	i

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

4.10 Determinación de número de yemas

La prueba de comparación de medias para la variable número de yemas de la planta exhibió diferencia estadística significativa en 6 grupos de tratamientos. El primer grupo incluyó a la dosis de 50 Gray con 14 yemas, el segundo grupo incluyó a testigo 100, 125 y 175 Gray con un número de yemas de 12 a 10, el tercer grupo a 100, 125, 150,

175 y 200 Gray con un número de yemas de 11 a 10, en el cuarto grupo encontramos a 75, 100, 150 y 200 Gray en un rango de 10 a 9 yemas, en el quinto grupo se incluye a las dosis de 250, 300, 350, 400, 450 y 500 Gray con un número de yemas entre 1.6 y 0.8 y en el sexto y último grupo a las dosis de 250, 350, 400, 450 500, 550, 600, 650, 700, 750 y 800 Gry de 1.6 a 0 yemas(Cuadro 4).

Cuadro 4. Respuesta en número de yemas en plantas de lisianthus expuestas a radiación gamma (^{60}Co)

Tratamientos	Número de yemas	
TESTIGO	12.00	b
50	14.00	a
75	9.29	d
100	10.63	bcd
125	11.29	bc
150	10.00	cd
175	11.29	bc
200	10.20	cd
250	1.60	ef
300	1.80	e
350	1.63	ef
400	0.26	ef
450	1.21	ef
500	0.80	ef
550	0.00	f
600	0.00	f
650	0.00	f
700	0.00	f
750	0.00	f
800	0.00	f

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

4.11 Diámetro de las plantas irradiadas con ^{60}Co

La prueba de comparación de medias para la variable diámetro de planta exhibió diferencia estadística significativa en 8 grupos de tratamientos. El primer grupo incluyó al testigo y la dosis de 50 Gray, con un diámetro superior a los 10 cm, el segundo grupo incluye a los tratamientos entre 100 y 125 Gray con un diámetro entre 8.4 y 7.9 cm, el tercer grupo incluyó los tratamientos 150 y 200 Gray con un diámetro de 5.9 y 6.1 cm, el cuarto grupo incluyó los tratamientos 75, 150, 175 y 300 Gray, con un diámetro entre 5.2, 5.9, 5.2 y 5.3 cm, en el quinto grupo los tratamientos de 350 y 450 Gray con un diámetro de 3.3 y 3.2 cm, el sexto grupo incluye los tratamientos 400 y 500 Gray, con un diámetro de 1.8 cm, séptimo grupo incluyó a las dosis 400, 500, 550, 650 Gray, con un diámetro de 1.8 a 1.3 cm, en el octavo grupo incluyó dosis de 550, 600, 700, 750 y 800 Gray, exhibieron el menor diámetro con valores entre 1.2 y 0.8 cm . (Cuadro 5).

Cuadro 5. Respuesta del diámetro en plantas de lisianthus expuestas a radiación gamma (^{60}Co)

Tratamientos	Diámetro	
TESTIGO	10.77	a
50	10.20	a
75	5.29	d
100	8.40	b
125	7.91	b
150	5.92	cd
175	5.20	d
200	6.10	c
250	2.29	f
300	5.31	d
350	3.36	e
400	1.88	fg
450	3.23	e
500	1.82	fg
550	1.26	hg
600	1.00	h
650	1.30	hg
700	0.80	h
750	0.80	h
800	0.80	h

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

V. CONCLUSIONES

- Se encontró un efecto radioestimulante, con un 80% de germinación en las semillas de *lisianthus E. grandiflorum* en dosis de 50 a 450 Gray.
- Dosis superiores a los 950 Gray se encuentra la letalidad de las semillas de *lisianthus*.
- Se obtuvieron plantas variantes en color y forma de las hojas.
- La mayor altura estuvo en el testigo y la dosis de 50 Gray, superior a los 12cm.
- Se obtuvo el mayor número de yemas en la dosis de 50 Gray con 14 yemas.
- Se exhibió el mayor diámetro, superior a los 10 cm en el testigo y 50 Gray.
- Se obtuvieron variantes en la M1 por la radiación, sin embargo no son cambios estables, hay que esperar a la M2 y seleccionar caracteres de interés agronómico.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Andrews Biology. 2012. Agentes Mutagénicos. (Consultada el 21 de agosto del 2015 en: http://biology-molecularvi.blogspot.mx/2012/04/5_2613.html).
- Alvarado, C., 1997. Estudio de tres híbridos de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) como flor de corte, en cuatro fechas de siembra con ambiente modificado en la zona de Quillota Universidad Católica de Valparaíso, Quillota. Fac. de Agronomía. Ed. PlaceQuillota. Chile. 61 pp
- Boutherin, D; Bron, G. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Primera edición. Zaragoza, Acribia. 225 p.
- Canul, K. J; García, P. F; Campos, B. E; Barrios, G. E. J; De La Cruz. T. E; García, A. J. M; Osuna, C. F.J y Ramírez, R. S. 2012. Efecto de la irradiación sobre nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3(8), 1495-1507.
- CONCYT. 2008. “evaluación de materiales genéticos del cultivo delisianthus (*eustoma grandiflorum*), bajo diferentes densidades de siembra, en condiciones ambientales controladas en la región de Eltejar Chimaltenango”. (Consultado el 17 de septiembre del 2015 en: <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.23.pdf>)
- Croft, B; Nelson, J. 1998. *Eustoma* (lisianthus). In: Ball, V. Ed. Ball Redbook. 16 th. Edition. Batavia. Ball Publishing. pp. 509- 512.
- Cubero, J. I. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal; 2º edición, Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. Pp. 567.
- Damiano C, B Ruffoni E, A.I. 1989. Tissue culture and micropropagation of *Lisianthus russellianus*, Hook. in Acta Horticulturae pp. 251.
- Datta, S. K. 2009. A report on 36 years of practical work on crop improvement through induced mutagenesis. Ed Shu Q: Induced plant mutations in the genomic era. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. Pp. 253-25.
- Domínguez, R. A. 2002 Cultivo del Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) Buenavista, Saltillo, Coahuila. Pp.2-10.

- Domínguez, R. A. 2008. Lisianthus: una especie con alto potencial. Consejo Mexicano de la Flor. Ornamentales. Primera parte: Marzo-abril. México. 16 (3) 24-25.
- Fé, C. D., Romero, M., Ortiz, R., Ponce, M. 2000. Radiosensibilidad de semillas de soya a los rayos gamma ^{60}Co Cultivos Tropicales, vol. 21, núm. 2. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba. pp. 43-47.
- Gravina, A; Major, G; Plestun, D. 1995. Introducción al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Primera edición. Montevideo, Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica. Uruguay. 33p.
- Harbaugh, B; Roh, M; Lawson, R y Pemberton, B. 1992. Rosetting of Lisianthus cultivars exposed to high temperature. HortScience 27(8) 885-887.
- Hernández, N. S.J. 2013. Inducción de mutaciones en heliconias por radiación recurrente con Cobalto 60. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Pp 11-13.
- Honda, I; Kikuchi, K; Matsuo, S; Fukuda, M; Saito, H; Ryuto, H; Fukunishi, N. and Abe, T. 2006. Heavy-ion- induced mutants in sweet pepper isolated by M1 plant selection. Euphytica 152:61-66.
- INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2011. ¿Qué es la mutagénesis inducida?. Consultada el 15 de Noviembre del 2015: en <http://inta.gov.ar/documentos/bfque-es-la-mutagenesis-inducida>.
- López, M. H; Carrillo, R. J; Chávez, S. J. 2012. Effects of gamma-irradiated seeds on germination and growth in *Capsicum annum* L. plants growth in a greenhouse. Acta Hortic. 947:77-81.
- Matsumura, A; Nomizu, T; Furutani, N; Hayashi, K; Minamiyama, Y and Hase, Y. 2010. Ray florets color and shape mutants induced by $^{12}\text{C}5$ ion beam irradiation in chrysanthemum. Sci. Hortic. 123:558-561.
- Melgares, A. J. 2002. El cultivo del Lisianthus para flor cortada. (Consultado el 12 de Octubre del 2015 en: <http://www.terra.es/personal4/jmacmu/ornamentales/lisiflor.htm>).
- Munsell. 2011. Cartas de determinación de color para tejido vegetal.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 5:473-497.

- Novak, F. J., Brunner, H. 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. IAEA Bull 4: 25-32.
- Otahola, V; Aray, M; Antoima, Y. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dentranthema grandiflora* (Ram) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. UDO Agrícola 1 (1): 56-63.
- Pabón, C. L. A. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflora edulis* Sim var. *edulis*). Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Departamento de Biología Posgrado en Biología. Bogotá, D.C. pp. 8-15.
- Paz, C. C. 2009. Evaluación de la relación NO₃: NH₄ en lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) cultivado en invernadero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. PP. 77.
- Predieri, S., Zimmerman, R.H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gammarays and field selection for productivity and fruit traits. Euphytica 3: 217–227.
- Rangaiah, S. 2006. Induced genetic variation for days to flowering and maturity following hybridization and mutagenesis in chilli (*Capsicum annum* L.). Karnataka J. Agric. Sci. 19:382-384.
- Ruud, L.M; Uffelen, V; Nico, S.P. 2005. Floriculture World Wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges Wageningen University and Research Centre Agricultural Economics Institute. The Netherlands. Pp. 1-2.
- Sakata, S. 2002. Series lisianthus. (Consultada el 17 de Septiembre del 2015 en: <http://www.sakata.com.mx/paginas/ptlisianthus.htm>).
- Santos, P. U.I. 2013. Inducción de mutaciones foliares en Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) utilizando agentes mutagénicos físicos y químicos. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. PP. 24-45.
- Schön, M. 1997. El cultivo del lisianthus en la Argentina. Horticultura Argentina 1(2): 13-14.
- Semeniuk, P. R. Griesbach, J. 1987. *In vitro* propagation of praire gentian. Plant cell, Tissue and Organ Culture 8:249-253.

- Seneviratne K. A. C; Wijesundra D. S. A. 2007. First African Violets (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.) With a changing colour pattern induced by mutation. American Journal of Plant Physiology 2 (3); 233-236.
- Wu, D. L.; Hou, S. W.; Qian, P. P.; Sun, L. D.; Zhang, Y. C. and Li, W. J. 2009. Flower color quimera and abnormal leaf mutants induced by ¹²C6 heavy ions in *Salvia splendens* Ker-Gawl. Sci. Hortic. 121:462-467
- Yamaguchi, H; Shimizu, A; Degi, K. and Morishita, T. 2008. Effects of dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breed. Sci. 60: 389-404.