



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

POSGRADO DE ESPECIALIDAD EN FLORICULTURA

**Propagación *in vitro* de lisianthus
(*Eustoma gradiflorum*, Giseb.) vr. Mariachi**

TRABAJO TERMINAL DE GRADO

PRESENTA

GABRIEL LEGUIZAMO SOTELO

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN FLORICULTURA**

**DIRECTOR DEL TRABAJO TERMINAL
Dr. CÉSAR VENCES CONTRERAS**

17ª PROMOCIÓN



Campus Universitario, "El Cerrillo",

El Cerrillo Piedras Blancas,

Toluca, Estado de México.

Enero de 2018

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág
1	Cuadro 1. Clasificación propuesta por Cronquist en 1982.	6
2	Cuadro 2. Características principales del lisianthus (<i>E. grandiflorum</i> , Giseb.), en la variedad Mariachi.	19
3	Cuadro 3. Concentración del medio básico MS para la germinación y desarrollo a evaluar, en la siembra de semillas de lisianthus.	20
4	Cuadro 4. Descripción de los tratamientos a evaluar (BAP y ANA), en la formación de brotes en lisianthus. Concentración en mgL ⁻¹).	22
5	Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable longitud del brote (LB) en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	31
6	Cuadro 6. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable longitud de brote (LB) en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	32
7	Cuadro 7. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable diámetro del brote (DB) en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	33
8	Cuadro 8. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable diámetro (DB) del brote en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	34
9	Cuadro 9. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable número de brotes (NB) en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	35
10	Cuadro 10. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable número de brotes (NB) en lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> , Giseb.), variedad Mariachi.	36

- 11 **Cuadro 11.** Análisis de varianza (ANOVA), para la variable número de Hojas por brote (NHB), en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi. 38
- 12 **Cuadro 12.** Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable número de hojas por brote (NHB), en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi. 38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Figura 1. Porcentaje de germinación (%G), en semillas de lisianthus, vr. "Mariachi".	25
2	Figura 2. Días a la germinación (DG), en semillas de lisianthus, vr. "Mariachi".	26
3	Figura 3. Porcentaje de Contaminación (%C), en semillas de lisianthus, vr. "Mariachi".	27
4	Figura 4. Longitud de la Plántula (LP), en lisianthus, vr. "Mariachi".	28
5	Figura 5. Longitud de la Raíz (LR), en lisianthus, vr. "Mariachi".	29
6	Figura 6. Número de Hojas en las Plántulas (NHP), en lisianthus, vr. "Mariachi".	30
7	Figura 7. Efecto de los tratamientos en la longitud de los brotes en lisianthus vr. "Mariachi".	32
8	Figura 8. Efecto de los tratamientos en relación al diámetro de los brotes (DB), en lisianthus vr. "Mariachi".	34
9	Figura 9. Efecto de los tratamientos en relación al número de brotes (NB), en lisianthus vr. "Mariachi".	37
10	Figura 10. Efecto de los tratamientos en relación al número de hojas por brote (NHB), obtenido en lisianthus vr. "Mariachi".	39

RESUMEN

Propagación *in vitro* de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.) vr. Mariachi

Gabriel Leguizamo-Sotelo¹. Ing. Agrónomo en Floricultura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Director del Trabajo Terminal: Dr. César Vences-Contreras².

¹ Estudiante del Posgrado de la Especialidad en Floricultura. Autor para correspondencia: leguizamo-uaemex@hotmail.com

² Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, Estado de México. Correspondencia: cvencesc@uaemex.mx

El lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), pertenece a la familia de las Gentianaceae de hábito cosmopolita, originaria de Texas, Arizona, Colorado y el norte de México. Es una planta de ciclo anual o bianual que se adapta a climas de baja humedad relativa y temperaturas extremas. Su introducción como planta ornamental se da en los años treinta, a través de sucesivos programas de mejoramiento genético, realizados por empresas japonesas, destacando a la compañía japonesa Sakata Seed.

En México, esta especie se cultiva en todas las zonas productoras de flores de corte del país, pero su área cultivable apenas alcanza las 5 hectáreas en producción. Debido a su importancia económica y a que es una especie esporádica debido a que no es fácil de cultivarla, por la dificultad que tiene durante su germinación y producción. De ahí la importancia de implementar un protocolo eficiente para la germinación y propagación *in vitro* de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.) en la variedad Mariachi, reduciendo tiempos en la germinación de 12 a 15 días (propagación sexual), a 6 días *in vitro*, un alto porcentaje en la germinación y sobre todo una propagación masiva en las variedades de mayor demanda para el mercado local.

En el presente trabajo se determinó la mejor técnica de desinfección, el medio de cultivo (MS al 50%), para la germinación de las semillas, obteniendo un promedio de 92.5% de germinación en lisianthus en la variedad Mariachi "Pure White" en 7.21 días. Con respecto a la formación de brotes, el mejor tratamiento, para la variable número de brotes (NB) por explante, fue el tratamiento T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), adicionándole al medio 0.0 mg/L⁻¹ de ANA y 1.0 mg/L⁻¹ de BAP; con un promedio de 12.500 brotes y para la longitud de brotes (LB), fue el tratamiento T₄ ANA (0.0) BAP (3.0), con un promedio de 2.1950 cm por brote, adicionando 0.0 mg/L⁻¹ de ANA y 3.0 mg/L⁻¹ de BAP.

Palabras clave: lisianthus, *Eustoma grandiflorum*, Giseb, propagación *in vitro*.

ABSTRACT

***In vitro* propagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.) vr. mariachi**

Gabriel Leguizamo-Sotelo¹. Agronomist in Floriculture. Autonomous Mexico State University. Faculty of Agricultural Sciences. Director of Terminal Work: Dr. César Vences-Contreras².

¹Graduate Student of the Specialty in Floriculture. Author for correspondence: leguizamo-uaemex@hotmail.com

²Center for Research and Advanced Studies in Plant Breeding. Faculty of Agricultural Sciences of the Autonomous University of the State of Mexico. Toluca-Ixtlahuaca Highway Km. 11.5. University Campus "El Cerrillo", C.P. 50200, Toluca, State of Mexico. Correspondence: cvencesc@uaemex.mx

Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), belongs to the Gentianaceae family of cosmopolitan habit, native to Texas, Arizona, Colorado and northern Mexico. It is a plant of annual or biannual cycle that adapts to climates of low relative humidity and extreme temperatures. Its introduction as an ornamental plant occurs in the thirties, through successive breeding programs, carried out by Japanese companies, highlighting the Japanese company Sakata Seed.

In Mexico, this species is cultivated in all production areas of cut flowers in the country, but its cultivable area barely reaches 5 hectares in production. Due to its economic importance and because it is a sporadic species because it is not easy to grow it, due to the difficulty it has during its germination and production. Hence the importance of implementing an efficient protocol for germination and *in vitro* propagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.) In the Mariachi variety, reducing germination times of 12 to 15 days (sexual propagation), to 6 days *in vitro*, a high percentage in the germination and especially a massive propagation in the varieties of greater demand for the local market.

In the present work, the best disinfection technique was determined, the culture medium (50% MS), for germination of the seeds, obtaining an average of 92.5% of germination in lisianthus in the variety Mariachi "Pure White" in 7.21 days. Regarding shoot formation, the best treatment, for the variable number of shoots (NB) per explant, was the treatment T2 ANA (0.0) BAP (1.0), adding to the medium 0.0 mgL⁻¹ of ANA and 1.0 mgL⁻¹ of BAP; with an average of 12,500 shoots and for shoot length (LB), it was the treatment T4 ANA (0.0) BAP (3.0), with an average of 2.1950 cm per shoot, adding 0.0 mgL⁻¹ of ANA and 3.0 mg L⁻¹ of BAP.

Key words: lisianthus, *Eustoma grandiflorum*, Giseb, *in vitro* propagation.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.2 Objetivo general	3
2.3 Objetivo específico	3
2.3 Hipótesis	3
III.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Origen del <i>lisianthus</i>	4
3.2 Importancia económica	5
3.3 Clasificación botánica	6
3.4 Descripción botánica	6
3.5 Ecología	6
3.6 Variedades comerciales	7
3.7 Propagación	8
3.7.1 Propagación sexual	8
3.7.2 Propagación asexual	8
3.8 Cultivo de tejidos vegetales	9
3.8.1 Cultivo del <i>lisianthus in vitro</i>	10
3.8.2 Germinación de <i>lisianthus in vitro</i>	12
3.8.3 Desinfestación de semillas en la germinación <i>in vitro</i>	13
3.8.4 Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>lisianthus</i>	13
3.8.5 Etapas del cultivo de tejidos	14
3.9 Reguladores de crecimiento	14
3.9.1 Inducción de callo y brote	16
3.10 Germinación convencional (Etapas de la germinación de la semilla)	16

3.11 Trasplante de las plántulas a campo	17
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Ubicación del sitio experimental	19
4.2 Fecha de evaluación del experimento	19
4.3 Descripción del material vegetal	19
4.4 Desarrollo del trabajo experimental	19
4.4.1 Experimento I. Germinación y desarrollo de plántula <i>in vitro</i>	20
a).- Desinfestación del material vegetal (semillas)	20
b).- Siembra de las semillas en el medio de cultivo	20
4.4.2 Diseño experimental	20
4.4.3 Variables respuesta a evaluar	21
4.4.4 Experimento II. Formación de brotes	22
a).- Formación de brotes	22
4.4.5 Diseño experimental	22
4.4.6. Variables a evaluar	23
V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
5.1 Experimento I. Germinación y desarrollo de plántula <i>in vitro</i>	24
5.2 Experimento II. Formación de brotes	31
VI.- CONCLUSIONES	40
VII.- RECOMENDACIONES	42
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	43
IX.- ANEXOS	48

I.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad en nuestro país se busca la producción de nuevas especies florícolas con alto potencial productivo y derrama económica. De acuerdo con Pitot, 2003; citado por Leguizamo, 2007. La floricultura es un negocio de grandes oportunidades a nivel mundial; el avance de las comunicaciones, conjuntamente con el desarrollo del tráfico aéreo, ha impulsado fuertemente esta actividad. Países como: Colombia, Israel, Tailandia, Kenia, Ecuador y Nueva Zelanda, que en la década de los ochenta del siglo pasado no figuraban como productores, se han convertido hoy en día en grandes exportadores.

La floricultura en nuestro país es de autoconsumo, ya que existen estadísticas que reflejan que el 95% de la producción se comercializa internamente y el resto se exporta principalmente a los Estados Unidos de Norte América y Canadá. Sin embargo, el principal estado productor de flores de corte, es el Estado de México con los siguientes municipios de acuerdo a su nivel de importancia en esta actividad: Villa Guerrero, Tenancingo de Degollado, Coatepec de Harinas, Texcoco, Ixtapan de la Sal y recientemente Malinalco.

La flor de *Eustoma grandiflorum*, Giseb (lisianthus) tiene una gran aceptación en el mercado internacional por su gran variedad de colores, número de botones florales, características que la hacen atractiva al consumidor, lo mismo ocurre para los consumidores de nuestro país.

En México, se ha constatado que algunas de las principales zonas productoras de esta especie son: En el Estado de México: Tenancingo, Villa Guerrero, Coatepec de Harinas, Texcoco y Zumpahuacán; en el estado de Morelos: Zacatepec; para el estado de Michoacán: Tuxpán Quitzeo y Zitácuaro; en el estado de Hidalgo: Mineral el Chico; en el estado de Puebla: Atlixco, San Juan Tianguismanalco, San Martín Texmelucan y San Pedro Cholula y en caso del estado de Coahuila: Arteaga. Siendo muy pocos productores dedicados a este cultivo, en todo el país.

Su importancia económica radica en que es una especie esporádica debido a que no es fácil de cultivarla, por la dificultad que tiene durante la germinación y producción. Sin embargo, tiene buena aceptación en el mercado, ya que el precio puede oscilar desde los \$100.00 hasta los \$150.00 en los principales mercados de venta, el cual también depende de la época de venta y de la calidad de la misma, alcanzando un precio promedio de \$ 60.00 a \$80.00 pesos por decena.

Por lo antes mencionado, se requiere de establecer protocolos de multiplicación masiva basados en el empleo de la técnica de la propagación *in vitro* para esta especie, la cual puede reducir tiempos en la germinación de 12 a 15 días (propagación sexual), y de 6 a 7 días *in vitro*, un alto porcentaje en la

germinación y sobre todo una propagación masiva en las variedades de mayor demanda para el mercado local.

Una alternativa a gran escala, es el cultivo de tejidos, el cual permite establecer en condiciones asépticas, estructuras vegetales (células, órganos y tejidos) en medios de cultivo definidos, bajo condiciones de incubación controladas (Mendoza, 2007). Resultando interesante el desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de lisianthus, el cual contribuya a una rápida multiplicación de esta especie en beneficio de los productores.

II.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1.- OBJETIVO GENERAL

Implementar un protocolo eficiente para la germinación y propagación *in vitro* de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.) variedad Mariachi.

2.2.- OBJETIVO (S) ESPECÍFICO (S)

- Probar y evaluar cuatro propuestas de desinfección para la germinación de semillas de lisianthus (*E. grandiflorum*, Giseb.), en la variedad Marichi.
- Generar un protocolo para la germinación de semillas y propagación de lisianthus, (*E. grandiflorum*, Giseb.), *in vitro*.
- Establecer un medio de cultivo en la germinación de semillas de lisianthus (*E. grandiflorum*, Giseb.), en la variedad Marichi.
- Evaluar diferentes concentraciones de hormonas *in vitro*, las cuales permitan la generación de brotes masivos por variedad.
- Encontrar la concentración hormonal correcta, que permitan el rápido enraizamiento de los brotes de tallos obtenidos de lisianthus (*E. grandiflorum* Giseb.), en la variedad Marichi.

2.3.- HIPÓTESIS

El implemento de técnicas modernas como la propagación *in vitro*, puede incrementar la cantidad y calidad en la producción de plántulas de lisianthus (*E. grandiflorum*, Giseb.), en la variedad Mariachi.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Origen del *lisianthus*

El *lisianthus* es originario de Texas, Arizona, Colorado (E.E.U.U) y en norte de México. Aunque se encuentra de forma silvestre en tierras desérticas, no es una planta de desierto verdadera. En su tierra nativa, el *lisianthus* se encuentra creciendo a lo largo de ríos y en tierras bajas donde siempre tiene agua fresca (Torres, 2011). 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 Gentianáceas, su nombre científico es *Eustoma grandiflorum* (Raf.) (Sinónimos *Lisianthus ruselliana* y *Eustoma rusellianum*), es planta de ciclo anual o bianual. Forma una roseta de hojas, sobre la que se desarrolla un tallo de 40 o 50 cm. de largo; en cuyo extremo aparecen las flores largamente pediceladas de 6 a 9 centímetros de diámetro y de colores entre el azul y púrpura, en las variedades silvestres (Debbie, 2003).

Domínguez (2008), menciona que es una planta nativa de los estados del norte de México y sur de los Estados Unidos. Su hábitat natural le permite adaptarse a condiciones de baja humedad relativa y temperaturas extremas. Para Melgares (1996), reporta que es una especie originaria de las praderas húmedas de la zona meridional de los Estados Unidos y norte de México. Su introducción en Europa y Japón se hizo en los años treinta y a través de sucesivos programas de mejoramiento realizados en su mayoría por empresas japonesas, se han obtenido diferentes cultivares híbridos. Es una importante planta ornamental cultivada principalmente en Europa, Japón y Estados Unidos (Halevy y Krofranek, 1984; Ecker *et al.* 1994).

La búsqueda de nuevas alternativas y complementos a los cultivos florales tradicionales tal como clavel, gladiolo entre otras especies, es cada vez mayor; empujada en gran parte, por la demanda creciente del mercado de nuevas especies. El *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* Raf.), pertenece a la familia de las gentianaceas, es una familia cosmopolita, en la que muchas de estas especies son plantas árticas o montañosas, con hojas en roseta en la base (Heywood, 1985).

El *lisianthus* puede ser una de esas especies que completan la producción floral en determinadas fechas del año, ya que su adaptación a las condiciones climáticas de nuestras explotaciones es buena, y puede ser cultivada sin necesidad de estructuras demasiado costosas, aprovechando las ya existentes. Su cultivo se puede realizar tanto para flor cortada como para planta de maceta. En España su cultivo es reducido, estando extendido en la actualidad en Japón, Estados Unidos, Holanda, Italia y Francia principalmente. Es una especie que se prevé aumente su demanda, ya que es muy atractiva para el consumidor, con gran variedad de colores, y buena duración en florero. Además su cultivo no presenta grandes problemas técnicos (PanAmerican, 2014).

De acuerdo con Heywood (1985). 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 filas de pétalos. Su reproducción se realiza normalmente por semilla, aunque también se puede hacer por esqueje o por cultivo in vitro de tejidos.

3.2. Importancia económica

Esta delicada planta anual fue introducida al viejo continente cerca del año 1935 y fue registrada por T. Sakata y Company's en el catálogo de exportación de 1952, los productores de flor de corte empezaron a cultivarlo en las regiones más frías de Japón, con el propósito de obtener flor de corte, teniéndose únicamente disponibles plantas con flores de color morado. Luego de varios años de cultivo estos productores comerciales por hibridación, cruzamientos y/o aprovechamiento de mutaciones, propagaron las plantas con inflorescencias de color blanco y rosa. En años recientes el lisianthus no es únicamente producido como flor de corte, sino que la producción en maceta y su popularidad se ha incrementado rápidamente en Japón (Anónimo, 1984). De acuerdo con Asen *et al* (1986), propone al lisianthus como una excelente planta para uso en jardín, en maceta para interiores mediante el uso de reguladores de crecimiento y/o para flor de corte, los cuales se han evaluado desde 1983, generándose hasta el momento suficiente información para su cultivo.

El interés actual por la producción de esta especie es debido: 1).- A la gran diversidad de colores y forma de las flores, 2).- La alta productividad y 3).- La rentabilidad que este presenta (Fox, 1998).

Entre las flores de corte *E. grandiflorum* es una planta de gran valor ornamental que está siendo introducida en los mercados internacionales con gran aceptación comercial gracias a sus sucesivos programas de mejora para la obtención de híbridos (Manzuela *et al.*, 2007). Esta planta está siendo cultivada como cultivo para flor de corte y en maceta. Su producción y popularidad está creciendo al ser considerada una planta de las diez más vendidas en el sistema holandés (Camargo *et al.*, 2004). De acuerdo con Corr y Katz (1997), el lisianthus se divide en flores simples y dobles, siendo el mercado europeo y japonés los que prefieren las simples, mientras que los mercados americanos y brasileños prefieren flores dobles. Sin embargo, García (1998), menciona que el cultivo del lisianthus es bastante nuevo en México, a pesar de que la planta es originaria precisamente de nuestro país. En otros países esta especie está empezando a tener una alta demanda y la gran oportunidad para nuestro país es lograr surtir con calidad esta demanda. En gran medida una de las ventajas de este cultivo es la rotación del capital en poco tiempo (3.5 a 4 meses); sin embargo, el cultivo es muy sensible y requiere de desarrollo tecnológico específico en cada lugar a producirse.

3.3. Clasificación botánica

Utilizando la clasificación propuesta por Cronquist (1982), el *lisianthus* se clasifica de la siguiente manera (Cuadro1).

Cuadro 1. Clasificación propuesta por Cronquist en 1982.

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embriobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Gentianaceae
Subfamilia:	Gentianaceae
Tribu:	Centarium
Género:	<i>Eustoma</i>
Especie:	<i>E. grandiflorum</i> (Giseb, Shinnnes y Raff).
Varietades:	Mariachi, Echo, Rosanne, Arena 1, 2 y 3, Avantange, Super Magic, ABC 1, ABC 2, Excalibur, Piccolo 1 y 2, Rosita 1, 2 y 3, etc.

3.4. Descripción botánica

Venning (1992), establece que es una planta herbácea anual o perenne erecta, a menudo con una roseta de hojas basales; presenta un tallo de 3 a 6 mm de diámetro, con hojas sésiles, opuestas, enteras, adnadas, ovales o lanceoladas u oblongas, con 3 nervaduras, una longitud de 2 a 6 cm, de color verde grisáceo similar al color de las hojas del clavel; tiene el tallo ramificado de la mitad hacia arriba donde sustenta dos pedicelos florales en la axila de las hojas superiores, las flores son vistosas con largos peciolo, solitarias, o en panículas; cáliz largo con lóbulos en la quilla de 15 a 20 milímetros de longitud, acuminado, corola penta o hexalobulada campanulada o infundiliforme compuesta por 5 a 6 lóbulos azules de 2 a 3 cm de longitud, morados y ocasionalmente blancos o rosas.

En su hábitat, con el centro más oscuro, negro o verde respectivamente, regularmente con lóbulos o dientes irregulares y denticulados; 5 a 6 estambres; filamentos filiformes, anteras oblongas y en disposición recta; su cápsula es oval a elipsoidal de 1 a 2 valvas sobre un largo peciolo, sus semillas son pequeñas (0.04 mm de diámetro; 22, 000 semillas por gramo), una vez secas son de color café obscuro, negro o pálidas. Las plantas son rizomatosas y alcanza una altura desde los 60 hasta los 80 centímetros (Heywood, 1985).

3.5. Ecología

Heywood (1985) describe que la familia de las gentianaceas es cosmopolita, muchas especies son plantas árticas o montanas; y se encuentra en condiciones salobres o pantanosas, otras viven como saprófitas sobre restos de vegetales en putrefacción, como *Voyria* en América tropical y África occidental. Actualmente los grandes géneros que se reconoce son *Gentiana* (400 especies,

cosmopolita, excepto África sur), *Gentianella* (125 especies, zonas templadas del norte y sur, excepto África del sur), *Saertia* (100 especies, normalmente de las zonas templadas del norte).

3.6. Variedades comerciales

Siendo Europa el pionero, en comenzar a realizar hibridaciones en *lisianthus* desde hace 18 años, desarrollamos un espléndido surtido de flores para flor de corte, para la producción durante todo el año, para el mercado interno y de exportación (Evanthia, 2017).

Esta planta de recientemente introducida a nuestro país (cerca de 20 años), posee flores de ocho centímetros de largo, que aparentan flores artificiales, las cuales florecen continuamente desde el verano hasta otoño, cada flor permanece abierta hasta por veinte días, teniendo al principio una apertura en tamaño y forma e tulipán holandés, y luego de siete a diez días, al crecer sus pétalos ligeramente doblados hacia abajo, aparentan una amapola (Klingaman, 1987).

Los híbridos de *lisianthus* tienen como características el definir ligeramente en su hábito de crecimiento de acuerdo al color, siendo los colores blancos y rosas ligeramente más altos que el resto (Tjia, 1986).

Hoy en día la casa comercial Fred C. Gloeckner & Company, Incorporated, provee semillas de *lisianthus* en una amplia gama de variedades y colores; en su catálogo 2016-2017, se puede constatar la gran diversidad de variedades, series, colores, formas, y grupo al que pertenecen de acuerdo a la zona de producción (Gloeckner, 2017).

En México la variedad más producida entre los productores destaca la serie Mariachi, en todos sus colores, ya que es una excelente variedad en la producción y el manejo de su post cosecha, así mismo es la serie más económica que podemos adquirir entre los diferentes proveedores y distribuidores de semillas en nuestro país.

Entre las series menos producidas en México, pero que por sus colores, formas y altos costos también suelen cultivarse entre los productores están: ABC 1, ABC 2, Advantage, Echo, Excalibur, Rosanne, Rosita 1, Rosita 2 y Super Magic.

Recientemente han aparecido varios hibridadores, que también ofrecen nuevas variedades y/o series de esta especie con un futuro prometedor, tal es el caso del hibridador Evanthia, quien está ofreciendo la serie F1 Minilisis II (*lisianthus* mini), la cual se considera un híbrido versátil para flor de corte con una abundancia de flores y capullos pequeños. Esta serie incluye floraciones dobles y sencillas, así como también en variedades picotee (Evanthia, 2017).

Todas las variedades se comercializan en presentaciones de 1000 semillas peletelizadas, el peso por 1000 semillas puede oscilar desde los .683 gramos hasta los .987 gramos por cada presentación.

3.7. Propagación

La planta puede ser propagada por medios sexuales, que es la más común, por reproducción asexual mediante el uso de la parte apical de la planta y/o por medio de cultivo *in vitro*.

3.7.1. Propagación sexual

Utilizando semilla, se considera que un gramo contiene alrededor de 20,000 a 22, 000 semillas y una onza contiene 625,000 semillas, por ello es que se comercializan recubiertas (paletelizadas), las cuales germinan de 12 a 15 días, requiriendo como temperaturas óptimas de 20 a 25°C y en caso de sobrepasar las temperaturas a los 30°C se puede provocar daño a la planta (Gloeckner, 2017).

3.7.2. Propagación asexual

Debido a que las poblaciones procedentes de almácigo proveen plantas que varían respecto a tiempo de floración, longitud del tallo, y número de flores, aunado a que al mantener líneas puras para la producción de híbridos es muy difícil por ser estos débiles, el uso de la propagación vegetativa de cultivares selectos es una buena alternativa ya que pueden ser utilizado el método convencional de propagación a través de esquejes aunado a su fácil enraizamiento. Se debe de considerar que la percolación de calcio por uso de agua dura o por la adición como nutriente en excesiva cantidad a través del sistema de aspersión provoca dormancia de la yema apical; teniéndose como inconveniente el obtener pocos esquejes de cada planta madre pero una vez cultivados, si se hace en bancales con calefacción en el sustrato, al provocarse un estrés por temperatura, se provocará dormancia de la yema apical y ello favorecerá la ramificación basal (Roh, 1984). De acuerdo con Halevy (1984), tomó esquejes de plantas madres durante el otoño, enraizándolos en perlita bajo microaspersión intermitente, obtuvo un excelente enraizado y una floración normal bajo invernadero durante el invierno del mismo año.

3.8. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales comprende un conjunto de técnicas basadas en el principio de la totipotencialidad celular. Estas técnicas permiten establecer en condiciones asépticas estructuras vegetales, células, órganos y tejidos en medios de cultivo nutritivo y bajo condiciones ambientales controladas.

Estas técnicas de propagación presentan ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que a partir de poco material vegetal, es posible obtener una rápida propagación a un gran número de plantas libre de patógenos. Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos vegetales son: la selección de variantes somaclonales, el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma y la micropropagación como tal. Esta última aplicación (micropropagación), es una técnica de cultivos de tejidos que desarrolla un sistema de propagación clonal masiva de material vegetal, libre de patógenos, con la subsecuente regeneración de nuevas plantas; también se ha centrado en la conservación de recursos genéticos de especies alimenticias, medicinales, forestales y ornamentales (Mazari y Rubluo 1984, Citado por Chávez y Rubluo 1995).

Las forma de regeneración vegetal o vías morfogenéticas son: 1).- La organogénesis y 2).- la embriogénesis somática.

La organogénesis define la forma y el crecimiento de los primordios unipolares a partir de yemas. Es decir, se originan plántulas incompletas; por lo que es necesario promover su enraizamiento. En este caso siempre existe una conexión vascular entre los nuevos brotes y el tejido paterno (Jiménez-González, 1998). Dentro de esta misma regeneración vegetal, se diferencian dos vías, que son:

1. Elongación celular de yemas axilares (activación areolar): se estimula el desarrollo de las yemas axilares y se presenta cuando se rompe la dominancia apical, por la adición de reguladores de crecimiento (citocininas) al medio de cultivo. Los individuos regenerados estables por lo que es el método más utilizado en la propagación comercial (Evans, 1990; Jiménez-González, 1988).
2. Formación de yemas adventicias: permite la formación de *novo* de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejidos no meristemáticos, la cuales se originan de una o un pequeño grupo de células, cuando los explantes se cultivan en medios con elevadas concentraciones de citocininas (Jiménez-González, 1998).

Puede ser directamente del explante (organogénesis directa) o a partir de callo (organogénesis indirecta), la cual consiste en una masa de tejido desorganizado de células vegetales inducido por la adición de reguladores de crecimiento (auxinas) al medio de cultivo (Schaeffer, 2003). Debido al origen de las yemas adventicias en esta vía existe una alta probabilidad que se produzca variación somaclonal.

En la embriogénesis somática se obtiene la formación de embriones a partir de células que no son producto de la fusión de gametos. Los regenerantes son estructuras bipolares con un meristemo apical y no radicular, los cuales no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y desarrollarse como plantas normales (Jiménez- González, 1998).

La aplicación de técnica de cultivo *in vitro* en plantas significa cultivar dentro de frascos de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento.

Para Pierik (1988), el cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. Por otra parte Alonso (2002), menciona que aunado a todo lo anterior también es indispensable el uso de citocininas y auxinas para tener respuesta en los explantes e ir manipulando la proporción de estos reguladores de crecimiento, los explantes pueden formar plantas directamente, o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares (brotes y/o raíces), la micropropagación es una alternativa a la propagación convencional, ya que utiliza explantes como: yemas apicales o laterales, segmentos de hojas, segmentos de raíz y/o protoplastos, en condiciones asépticas, donde pueden controlar las condiciones como: luz, temperatura y nutrientes.

3.8.1. Cultivo del lisianthus *in vitro*

La multiplicación de clones asexual de clones selectos a través del cultivo *in vitro*, puede ser valioso en lisianthus, es decir, la manipulación de las plantas individuales seleccionadas que poseen características deseables como lo son alteraciones en el tamaño de la planta, desarrollo, color, forma de las flores, así como resistencia a enfermedades (Semenuik & Griesbach, 1987).

Griesbach (1987), argumenta que esta planta puede propagarse *in vitro* utilizando como medio de cultivo básico el de Murashige-Skoog, suplementado con 0.1 miligramos por litro y en la misma unidad (mg/l) tiamina 0.1, ácido nicotínico 0.5, mio-inositol 100, 2 de glicina, 3 gramos de sacarosa y 6 gramos de bactoagar. Se utiliza como medio de propagación yemas apicales de .2 a .5 mm de largo, secciones de tallos de hoja internodal de .5 a 1.0 cm, pedazos de hojas de un centímetro cuadrado cada uno y/o brotes apicales de 10 milímetros de largo. El pH del medio se ajusta a 5.7 ± 1 antes de ser esterilizado a 121°C por 15 minutos. Los materiales vegetativos (explantes) deben ser desinfectados con hipoclorito de sodio al .05% (10% de Clorox®), por veinte minutos para posteriormente enjuagarse tres veces con agua esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar y ser cultivados en los frascos transparentes con 20 mililitros de medio de cultivo, en un anaquel bajo

fotoperíodo de dieciséis horas iluminando con $260 \mu\text{mol S}^{-1} \text{m}^{-2}$ y una temperatura de 24°C y 16 a 18°C para los periodos de oscuridad respectivamente.

Para los explantes de puntas de crecimiento y brotes apicales se les añade al medio de cultivo 3 mg/l de benciladenina (BA) + 0.2 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) para favorecer la generación de vástagos en la porción basal del explante. Los entrenudos del tallo solo requieren de la misma concentración de BA y ANA, más una auxina no usada en esta prueba, para tener brotes que se desarrollen adecuadamente (Roh, 1984).

Para el caso del explante foliar (secciones de hojas), solo requieren que se añada BA para la formación de callo en la orilla del segmento y a partir de ahí generar o formar vástagos, que en este caso fueron los de mejor calidad, mientras que los brotes apicales proliferaron muy fácilmente, lo cual, os hace como la mejor perspectiva para la propagación en masa de clones o cultivares selectos. Una vez obtenidos los microesquejes de 5 milímetros , se enraízan en el interior de un medio diluido a la mitad añadiéndole 2 mg/l de AIA, obteniéndose un enraizamiento adecuado entre 20 y 25 días, para ser trasplantados a un medio comercial (Promix II), proporcionándoles micro aspersion intermitente hasta obtener su aclimatación desarrollo y floración normalmente (Semeniuk. 1987).

Griesbach (1987), utilizo la misma metodología y obtuvo brotes generados del tallo y no de yemas adventicias y/o axilares en los tres tipos de explantes (tallo, meristemo y hoja), para enraizarlos posteriormente en un medio de cultivo de Murashige-Skoog a un medio de su concentración adicionado con $2 \text{ miligramos por litro}$ de AIA, presentándose características fenotípicas de un solo tallo y ramificación basal en la parte media superior de la planta y solo pocos individuos con ramificación basal intensa, (con un 1.3% de ramificación genética somaclonal) produciendo más flores que las de un tallo y obteniendo cuatro variantes fenotípicas: enanismo, tallos ramificados basalmente, tallos fuertes y hojas largas. El grado de ramificación basal de los microesquejes va de 2 a 5 por tallo principal, quizá por la alta concentración de citocininas utilizadas durante el cultivo ($3 \text{ miligramos por litro}$ de benziladenina), ya que se sabe que las citocininas tienen la capacidad de inducir la ramificación basal al aplicarse exógenamente a las plantas cultivada *in vitro*; aún la ramificación de los esquejes puede verse afectado por varios meses después de haberse removido del cultivo *in vitro*, ya que se induce brotación lateral al romper su dormancia e influir posteriormente en el hábito de crecimiento de la planta, aunque también influye esto, la luz, temperatura y la nutrición que se le provea al cultivo. La baja frecuencia de ramificación basal por genética somaclonal es del 1.3% y puede deberse a la regeneración del lisianthus a partir del callo primario (1 a 2 meses) pudiéndose quizás incrementar mediante el uso de los callos secundarios de cuatro a veinte meses de edad donde se incrementa la frecuencia de las variantes somaclonales trasmisibles como un cambio permanente. Sin embargo, para Damiano (1986), establece como mejor medio de proliferación aquel que incluye nutrientes minerales más 0.5 ppm de ácido nicotínico, 0.5 ppm de piridoxina, 0.1 ppm de tiamina, 100 ppm de mio-inositol, 2 ppm de glicina, $.03 \text{ ppm}$ de benciladenina, $30 \text{ gramos por litro}$ de

sacarosa y 6 gramos por litro de bactoagar, ajustándole el pH a 5.8 y posteriormente como medio para su enraizamiento el medio Murashige-Skoog a la mitad de su concentración, adicionado con 1.25 ppm de ácido nicotínico, 0.25 ppm de pirodoxina, 0.05 ppm de tiamina, 50 ppm de mio-inositol, 1 ppm de glicina, 1 ppm de AIA, 30 gramos de sacarosa y 6 gramos de bactoagar por cada litro de medio de cultivo preparado, ajustando de igual forma el pH a 5.8 ± 1 , con lo cual se obtiene de un 84 a 100% de enraizamiento *in vitro*.

Estos estudios implican que el cultivo de tejidos puede ser muy efectivo para producir variaciones genéticas nuevas del *lisianthus* como la somaclonal de ramificación basal, ello debido a que sería importante el incremento en el número de flores, para el caso de los tipos de flor cortada y plantas más compactas para el caso de las especies a producirse en maceta Griesbach (1987). Esta propuesta la apoya Fischer (1987), cuando observa el 55.4% de formación de vástagos múltiples al establecer sobre el medio Knudson modificado semillas botánica de *lisianthus*, luego de tres meses de cultivo *in vitro*. En continuación con sus trabajos Griesbach (1987), buscando variación somaclonal en R_1 obtiene como sobresalientes: a) variante enano, con menos de 250 milímetros de alto, con hojas y flores de tamaño normal, pero con menor número y longitud de ellos, por lo que lo hace apto para cultivo como planta de jardín y borduras, b) variante minuta con pocos entrenudos pero de tamaño normal, con flores y hojas de la mitad de su tamaño, apto para producirse en maceta y c) variante con ramificación basal apto para la producción como flor de corte. Mientras que en R_2 obtiene cambios adicionales pudiendo hacer pudiendo ser un control la variación somaclonal mediante el uso de callos viejos para general fácilmente nuevas variaciones y/o individuos, debido a que, cada vez, que se divide una célula, 1×10^6 genes se pueden ser mutantes y en el calo viejo se proveen más divisiones celulares, otra manera es el uso de hormonas, por ejemplo reduciendo la concentración de citocininas o por incremento en la concentración de auxinas, lo cual favorece la formación del callo y el uso de concentraciones inversas provee producción de brotes o mediante el uso de una auxina fuerte como el 2-4 D o aún cambio físico que favorecen la formación de callo y ello incrementa la posibilidad de variación somaclonal.

3.8.2. Germinación del *lisianthus in vitro*

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

El crecimiento del embrión durante la maduración se va deteniendo y continua así después de la dispersión ya sea por falta de condiciones ambientales adecuadas para su reanudación o por factores

internos que lo impiden. En condiciones normales, la germinación oscila entre los 10-20 días (Jiménez, 1990).

La germinación *in vitro* tiene mucho más éxito, pudiendo alcanzar hasta el 100% de la germinación y plántulas listas para la aclimatación aproximadamente a 3 semanas (Damiano, *et al.* 1989).

De acuerdo con Damiano, *et al* (1989), utilizo semillas de de las variedades azul y rosa de *lisianthus*, germinándolas en un medio Brooks & Houg, (1958), con alguna modificaciones, la condiciones del cultivo fueron 24°C (+/-1°C); fotoperiodo de 16 horas y 3500 lux. Los resultados obtenidos por el autor tuvieron un alto porcentaje de germinación (98-100%), germinando las semillas en los primeros 6 días, estando las plántulas para su aclimatación en tres semanas.

3.8.3. Desinfestación de semillas en la germinación *in vitro*

El protocolo de germinación para muchas especies ornamentales es similar y se describe a continuación: 1).- la semilla se sumerge en etanol al 70-95% durante 1- 4 minutos; 2).- continuando con una inmersión en hipoclorito de sodio al 1.2% (20% de blanqueador comercial, el cual contiene el 5 ó 6% de hipoclororito de sodio, Clorox®), por 20 minutos; 3).- enjuagar las semillas de 4 a 5 veces con agua destilada y 4).- dejarlas en agua destilada durante la siembra de las semillas desinfectadas (Sharp, 1984).

Damiano, *et al* (1989), propone un procedimiento de desinfectación, el cual consiste en esterilizar las semillas al 1.5 % de hipoclorito de sodio, durante 20 minutos, enjuagando dos veces con agua estéril y posteriormente se colocan las semillas en el medio de cultivo.

3.8.4. Micropropagación *in vitro* de *lisianthus*

Los métodos convencionales de propagación vegetativa se han utilizado en las plantas heterocigotas de muchas especies para ser multiplicadas y perpetuadas ya sea para su uso en el mejoramiento genético o para utilizarlas en la propagación de cultivares selectos. La propagación *in vitro* generalmente referida como micropropagación, hoy en día se aplica a un número de especies y potencialmente todas las plantas superiores pueden ser clonadas rápidamente bajo condiciones altamente controladas (Yeoman, 1986).

3.8.5. Etapas del cultivo de tejidos.

Murashige (1974), menciona que la propagación de una planta a través del cultivo de tejidos es llevada a cabo por una secuencia de pasos semejante a un procedimiento comercial, dicha secuencia puede ser identificada y virtualmente optimizar las condiciones de casa una para su establecimiento. El principio tiene cuatro principales pasos, cada etapa con un diferente objetivo y posiblemente con diferentes requerimientos. Las etapas son: a).- establecimientos de un cultivo aséptico; b).- etapa de la multiplicación del propágalo, c).- establecimiento de las plantas a suelo y d).- transferencia a condiciones ambientales naturales.

3.9. Reguladores de crecimiento

El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por ciertas sustancias químicas, que en conjunto, ejercen una compleja interacción para cubrir las necesidades de la planta. Se han establecido cinco grupos hormonas vegetales: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno. Estas sustancias están ampliamente distribuidas y se encuentran en forma natural en todas las planta superiores. Son específicas en cuanto a su acción, ejercen su actividad a muy bajas concentraciones y regulan el crecimiento de las células, la división y la diferenciación celular, así como la organogénesis, la senescencia y el estado de latencia. El término reguladores de crecimiento se aplica a las hormonas vegetales sintéticas, y estas forman parte de la mayoría de los medios de cultivo. Básicamente se utilizad dos: las auxinas y las citocininas, las primeras se utilizan en un rango de 0.1 a 10 mg/L, mientras que las segundas van de 0.3 a 30 mg/L .

El nombre de auxinas, significa “crecer” y es dado a un grupo de sustancias que su principal efecto es la estimulación de alargamiento, división celular y diferenciación, formación de vástagos axilares y adventicios, influye también en el proceso de formación de frutos y raíces, promoviendo además una diferenciación o formando masas de células indiferenciadas (callos); ampliamente usadas en medios de cultivo son el Ácido Indolacético (AIA), Ácido Indolbutírico (AIB), Ácido Naftooxiacético (ANA), Ácido 2-4- Diclorofenoxiacético (2-4-D). Su función como el resto de las hormonas vegetales está dada en base a su concentración, cuando la auxina predomina tiende a formar raíces o callos. Dentro de la citocininas están: la Kinetina (KIN), la Bencilaminopurina (BAP), etc., las cuales funcionan como inductoras de crecimiento de brotes y represoras de la dominancia apical. Cada tipo de regulador, cada concentración, así como cada combinación de regulador dará respuesta a un crecimiento distinto (Hurtado y Merino, 1988).

Sabiendo que las auxinas juegan un papel muy importante en el desarrollo vegetativo, se han desarrollado auxinas sintéticas que son utilizadas en el área agronómica y biotecnológica. El desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos. Entre los factores internos se incluyen a las hormonas (fitohormonas), las cuales se definen como señales químicas que solicitan la comunicación y coordinación de sus actividades (Azcon y Talon, 2001). En el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se utilizan principalmente para estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta que se produce tras la aplicación al explante depende de la edad fisiológica del material vegetativo, de la naturaleza de las auxinas, de la concentración y del tiempo de aplicación (Grattapaglia *et al.*, 1998).

Las citocininas, son aquellas sustancias químicas que se activan directamente de la división celular, proliferación de yemas axilares, dominancia apical, están relacionadas con el periodo de la juvenilidad y su deficiencia induce síntomas de senescencia. Estas interactúan con las auxinas en la regeneración del crecimiento, alargamiento y división celular, pueden ser necesarios para estimular el desarrollo de un meristemo inactivo: existen tres citocininas fácilmente disponibles: Kinetina, Benciladenina y la Zeatina (Hurtado y Merino, 1988).

Las citocininas regulan varios procesos del desarrollo de las plantas, gran parte de estos procesos están afectados por otros estímulos, especialmente ambientales y hormonales. Como caso típico de esta interacción de citocininas con las auxinas que se utilizan para regular la neoformación de órganos *in vitro* y controlan la dominancia apical fundamental en la industria de la micropropagación. Durante la etapa de multiplicación, el principal objetivo es la de proporcionar la mayor cantidad de brotes a través de los subcultivos sucesivos a partir de meristemas (Debergh, 1990). Por lo general, el medio de cultivo es similar al de la fase de establecimiento y es común utilizar citocininas con el propósito de estimular la división celular e inhibir la dominancia apical para lograr el crecimiento de brotes (Azcon y Talon, 2001).

Han *et al* (1995, 1996a) obtuvo multiplicación de explantes de *Gypsophilia* utilizando un medio MS con 0.5 mgL^{-1} de ANA y 0.5 mgL^{-1} de BA. En otro trabajo (1996b), los mismos autores obtuvieron mejores resultados cuando el medio MS suplementado con 2.0 mgL^{-1} de BA y auxinas como ANA y AIA en una concentración de 0.05 mgL^{-1} cada uno.

Por otra parte Mendoza y Muñoz (1994), propagando *in vitro* a *Gypsophilia paniculata* en la fase de multiplicación utilizando un medio suplementado con 0.5 mgL^{-1} de ANA 3.0 mgL^{-1} de BA obteniendo ocho brotes por explante, dentro de cinco semanas.

3.9.1. Inducción de callo y brote

El termino callo se define como un tejido indiferenciado obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales luego son llevados a una diferenciación celular. Estas células presentan proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que da lugar a una masa amorfa de tejido, algunos callos masas celulares compactas, mientras que otros son esponjosos. La inducción de callo a partir de una porción del vegetal sucede cuando el inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua (Hurtado y Merino. 1988).

Los explantes de casi cualquier parte de la planta o de la semilla pueden formar callo, previa desinfección y colocación en el medio de cultivo apropiado. Las auxinas en una concentración de moderada a alta son las sustancias primarias de crecimiento para la inducción de callo, como el Ácido Indolacético (AIA), el ANA y el 2-4-D; también deben de suministrar en cantidades menores las citocininas como la Kinetina (KIN) y la BAP (Hartman-Hudson *et al.* 1997).

Torres-Fernández *et al.* (1989) hicieron mención de que el Ácido 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético), es un regulador usado muy ampliamente en la inducción de callo, pero es necesario transferir en corto tiempo a un medio con citocininas para así mantener el potencial de regeneración del vástago. Por el contrario Acram *et al.* (1996), menciona que los tejidos desarrollados *in vitro* frecuentemente presentan un desorden fisiológico llamado vitrificación, que puede acarrear problemas, ya que afecta la multiplicación de brotes y el vigor del cultivo e impide la posterior aclimatación de las plántulas. Esto es causado en muchos de los casos por altas concentraciones de citocininas o por el agente solidificante usado. La apariencia externa del tejido cultivado *in vitro* se aprecia translúcido e hiperhidratado.

La producción de brote puede llevarse a cabo directamente del explante o del callo y esto dependerá de las hormonas suministradas (Hartman-Hudson *et al.* 1997).

3.10. Germinación convencional (Etapas de la germinación de la semilla)

El costo de la plántula es relativamente alto, debido a que presenta una germinación no uniforme, lo que dificulta la automática en la cámara de germinación (Pergola, *et al.* 1992). La siembra se realiza en charolas de plástico preparando un sustrato de peat moos y perlita todo esto debe de ser estéril, la semilla se cubre con una capa ligera de vermiculita. El sustrato debe de 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 lugares ventilados a una temperatura no menor a 15°C y no mayor de 27°C. Se recomienda fertilizar con nitrato de calcio (150 ppm). Se debe de evitar temperaturas extremas, para evitar arrojamiento, también prevenir enfermedades fungosas. Las plántulas deben de ser vigiladas hasta que tenga 4 pares de 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 pérdidas en la calidad y mermas en el trasplante (Domínguez, 2002).

PanAmerican Seed (2012), establece una guía para la germinación de semillas de *lisianthus*, la cual se describe a continuación:

a).- Etapa 1: La siembra se realiza en charolas plásticas de 288 cavidades, preparando un sustrato con 60% de turba (peat moss) y 40% de perlita, la semilla se cubre con una capa ligera de vermiculita. Mantenga el sustrato húmedo hasta la germinación con una temperatura de 20° C a 24° C, mantener el pH entre 6 - 6.5.

b).- Etapa 2: Después de que emergió la plántula, colocar las charolas en un lugar ventilado y a temperatura menor a 15° C y no mayor a 27°C. Fertilice con 150 ppm de Nitrato de Calcio, usando un sistema de nebulización para mantener la humedad, y hacer uso de un ligero sombreado.

c).- Etapa 3: Evite temperaturas extremas para evitar arrojamiento, dar un poco más de luz y evitar exceso de humedad para prevenir enfermedades fungosas.

d).- Etapa 4: Revisar frecuentemente la plántula hasta completar 4 hojas verdaderas, 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.

3.11 Trasplante de las plántulas a campo

De acuerdo con Domínguez (2002). Sobre la cama de cultivo se prepara una malla 12.5 cm por 15 cm, lo que da una densidad de 50 plantas por m², durante el desarrollo del cultivo se irá subiendo para servir de soporte y posteriormente se prepara otra malla que soporte a la altura de los botones (25 x 30 cms.). Al recibir la plántula se debe de realizar una inmersión total de las charolas en una solución preparada con 1.5 gramos de Ridomil y 1.5 gramos de Tecto por un litro de agua, posteriormente se trasplanta teniendo los cuidados necesarios.

PanAmerican (2014), menciona que las plántulas se trasplantan en la cama de cultivo cuando tienen 4 hojas verdaderas. Es importante trasplantar una plántula con un sistema de raíz activo. Para evitar problemas con pudrición del tallo, no plantar demasiado profundo. Durante los primeros 15 – 20 días posteriores al trasplante es recomendable regar con manguera y una regadera fina, tratando de no maltratar las plantas; es muy importante mantener el suelo con bastante humedad para evitar estrés

en la planta. Después de establecida la planta (20 días) el riego se realiza normal con cintillas de goteo, ya que es recomendable reducir la humedad relativa y evitar que la planta se mantenga mojada para evitar el riesgo de ataques de hongos (a lo que es muy susceptible).

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del sitio experimental

El experimento se realizó, en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales (LCTV), de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Con una ubicación geográfica de 19° 14' de latitud Norte, 99° 42' de longitud Oeste y una altitud de 2,656 m.s.n.m. con una temperatura máxima de 22°C y una mínima de -1 °C. Y una humedad relativa entre 60 y 70%, una intensidad lumínica de 34,000 Lux, dentro del invernadero y 135, 000 lux en el exterior del mismo, con presencia de heladas (Noviembre a Marzo) y una precipitación media anual de 878.4 mm (García, 1988).

4.2. Fecha de evaluación del experimento

La presente investigación se desarrolló durante el último semestre de la especialidad en Floricultura de Agosto de 2017 a Enero del 2018.

4.3. Descripción del material vegetal

Se utilizaron semillas de lisianthus (*E. grandifloru*, Giseb.), en la variedad Mariachi, material genético procedente del hibridador Sakata Seed Company. Se emplearon 40 semillas para la variedad evaluada, de acuerdo a las características de la variedad se menciona en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características principales del lisianthus (*E. grandiflorum* Giseb.), en la variedad Mariachi.

VARIEDAD	Color	Tipo	Características
Mariachi	<i>Pure White</i> (Blanco).	Flores dobles y cuádruples	Variedad más aceptada por los productores por presentar flores cuádruples, tallos robustos y una amplia gama de colores.

4.4. Desarrollo del trabajo experimental

El trabajo experimental se llevó a cabo en dos etapas que consistieron en la germinación de las semillas y la formación de brotes.

4.4.1. Experimento I. Germinación y desarrollo de plántulas *in vitro*

a).- Desinfestación del material vegetativo (semillas)

Para el desarrollo del presente trabajo, se estableció el siguiente procedimiento para la desinfestación de la semilla, la cual estaba cubierta de un pellet. Para ello se realizó como a continuación se describe: 1).- Se sumergieron las semillas en agua jabonosa (3%), por 3 minutos, 2).- Posteriormente fueron sumergidas en etanol (70%), por 30 segundos, 3).- Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (1.5%) por 15 minutos, 4).- Posteriormente se dieron tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar y 5).- Se realizó la siembra *in vitro*, en el medio de cultivo a evaluar.

b).- Siembra de las semillas en el medio de cultivo

El procedimiento a seguir se describe a continuación: 1.- Se depositaron cinco semillas de cada color en cada uno de los frascos que contenían 20 ml medio de cultivo nutritivo y 2.- Con la ayuda de instrumental de disección (pinzas y bisturí), previamente estéril y dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a la siembra el día 26 de junio del 2017. Los frascos fueron colocados en el cuarto de incubación a una temperatura de 25°C +/- 2°C, un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 2,000 lux. Los tratamientos que se establecieron se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración del medio básico MS para la germinación y desarrollo a evaluar, en la siembra de semillas de *lisianthus* vr. *Mariachi*.

MEDIO DE CULTIVO	TRATAMIENTOS			
MS	T1	T2	T3	T4
	100%	75%	50%	25%

El medio de cultivo base fue el MS suplementado con 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar ajustando a un pH de 5.7 ± 0.1.

4.4.2. *Diseño experimental*

El experimento se estableció bajo un diseño complementario al azar (DCA) debido a las condiciones homogéneas a considerar. El diseño experimental, consistió en 4 tratamientos con 10 repeticiones y como unidad experimental se manejó 5 semillas de *lisianthus*. Posteriormente los datos obtenidos se evaluaron por medio de un paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System); para la comparación de promedios se aplicó una prueba de medias de Tukey al 0.05.

4.4.3. Variables respuesta a evaluar

a).- Días a Germinación (DG)

Esta variable se midió en días después de la siembra (DDS), y solo se contabilizaron las plántulas que iniciaron a germinar después de 3, 6, 9, 12 y 15 días.

b).- Porcentaje de Germinación (PG)

Se cuantificó en porcentaje de germinación (%) que se obtuvo por cada uno de los tratamientos a evaluar, de acuerdo a los días antes mencionados.

c).- Porcentaje de Contaminación (PC)

Se cuantificó el grado de contaminación (%) que se obtuvo por cada una de los tratamientos a evaluar.

d).- Longitud de la plántula (LP)

Se midió la longitud de cada una de las plántulas (cm), a partir de la cuarta semana de haber germinado (30 días).

e).- Longitud de la Raíz (LR)

Esta variable se midió en centímetros a partir de los 30 días de haber germinado la plántula *in vitro*.

f).- Número de Hojas (NH)

Se contó el número de hojas que presenta cada una de las plántulas por repetición en cada uno de los tratamientos evaluados después de los 30 días de haber germinado.

4.4.4. Experimento II. Formación de brotes

a).- Formación de brotes

La siembra se efectuó cuando las plántulas formadas tenían 90 días después de haber sido germinadas, con un promedio de 5 cm de longitud, como se describe a continuación: 1).- Se tomaron secciones de cada una de las plántulas (microesquejes), con una longitud de 1 a 1.5 cm de largo, eliminando las puntas terminales o de crecimiento vegetativo de cada una de las plántulas y 2).- Se colocaron 3 explantes por cada frasco que contenía 20 ml del medio de cultivo, con la finalidad de inducir la formación de brotes. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 2,000 lux.

Los tratamientos evaluados fueron el producto de la combinación de cuatro concentraciones de BAP ($0.0, 1.0, 2.0$ y 3.0 mg L^{-1}) y tres concentraciones de ANA ($0.0, .4$ y $.8 \text{ mg L}^{-1}$), haciendo un total de 12 tratamientos con medio de cultivo MS suplementado con 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH de $5.7 \pm .01$. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos a evaluar (BAP y ANA), en la formación de brotes en *lisianthus*, concentración en mgL^{-1} .

BAP \ ANA	0.0 (mgL^{-1})	1.0 (mgL^{-1})	2.0 (mgL^{-1})	3.0 (mgL^{-1})
0.0 (mgL^{-1})	T1	T2	T3	T4
0.4 (mgL^{-1})	T5	T6	T7	T8
0.8 (mgL^{-1})	T9	T10	T11	T12

4.4.5. Diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño complemente al azar (DCA) debido a las condiciones homogéneas a considerar. El experimento constó de 12 tratamientos con 5 repeticiones y como unidad experimental se manejara tres explantes de 1.0 centímetro de longitud con un total de 180 unidades experimentales. Posteriormente los datos obtenidos se evaluaron por medio de un paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System); para la comparación de promedios se aplicará una prueba de medias de Tukey al 0.005.

4.4.6. Variables respuesta a evaluar

a).- Longitud del Brote (LB)

Se midió la longitud de cada una de los brotes (cm), a partir de los 50 días, de haberse realizado la transferencia al medio de cultivo a evaluar (tratamientos).

b).- Número de Brotes (NB)

Se contó el número de brotes que cada explante emitió como respuesta al medio de cultivo (tratamiento) que se evaluó.

c).- Diámetro del Brote (DB)

Se midió el diámetro (mm), de cada uno de los brotes emitidos por cada uno de los tratamientos evaluados.

d).- Número de Hojas por Brote (NHB)

Se cuantifico el número de hojas que presento cada uno de los brotes emitidos por tratamiento evaluado.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos de la presente investigación realizada se presentan y se discuten acorde a la metodología planteada.

Considerando el procedimiento y la metodología previamente señaladas, se trató de manejar el experimento lo más homogéneo posible para evitar errores experimentales, los cuales no repercutieran en el trabajo.

5.1. Experimento I. Germinación y desarrollo de las semillas

a).- *Días a Germinación (DG)* y b).- *Porcentaje de Germinación (PG)*

En la primera etapa del trabajo (Experimento I) se presenta un logro del 85% de la germinación de los embriones cigóticos (Figura 1), con un promedio de 7.21 días (Figura 2), lo cual se debe a la madurez fisiológica y al manejo que se realizó durante la germinación *in vitro*.

Lo cual demuestra la importancia del medio de cultivo, de la técnica de desinfestación, para obtener un mejor resultado en el proceso de la germinación *in vitro*. Ya que como menciona Pergola, *et al* (1992), que inicialmente la semilla pudo llevar a cabo la inhibición de agua, síntesis de las enzimas, elongación celular y la emergencia; de la radícula, así como la digestión y traslocación de sustancias alimenticias almacenadas en el endospermo. La desventaja es que el endospermo de la semilla de *lisianthus* es demasiado pequeño (comercialmente se vende como semilla paletelizada), por lo que no es capaz de llevar a cabo su crecimiento una vez que disminuyó el peso total de los tejidos de almacenamiento, además de que en condiciones de *in vitro* la planta tiene un pobre desarrollo fotosintético por lo que pasa ser heterótrofa al momento de que sus reservas se han terminado. Por lo cual cabe mencionar que la importancia del medio de cultivo (nivel nutricional), es de suma importancia durante el proceso de germinación que en el momento de que la planta inicia su crecimiento.

Nau (1958), menciona que el porcentaje de germinación del *lisianthus* es del 80 al 90%, con un promedio de 10 a 20 días; bajo un proceso de germinación convencional. Sin embargo, el porcentaje de germinación *in vitro* va de un 98% a un 100%, germinando en los primeros 6 días a partir de la siembra bajo condiciones (Damiano, 1989). Resultados muy similares se obtuvieron con respecto a este autor, quien menciona que él utilizó semillas de las variedades azul y rosa de *lisianthus*, germinándolas en un medio Brooks & Houg, (1958), con algunas modificaciones, la condiciones del

cultivo fueron 24°C (+/-1°C); fotoperiodo de 16 horas y 3500 lux. Los resultados obtenidos por el autor tuvieron un alto porcentaje de germinación (98 -100%), germinando las semillas en los primeros 6 días, estando las plántulas para su aclimatación en tres semanas. Por ende también se puede tener material libre de plagas y enfermedades e inducir a la formación de brotes, para incrementar masivamente nuestro lote *in vitro*.

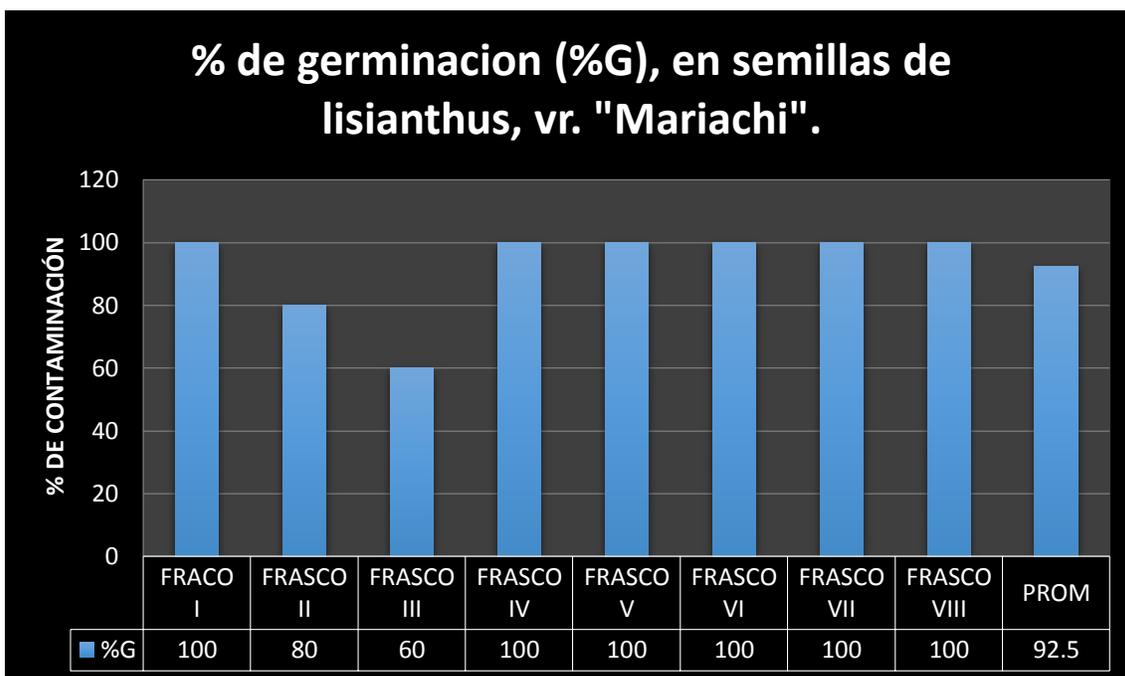


Figura 1. Porcentaje de germinación (%G), en semillas de lisianthus, vr. "Mariachi".

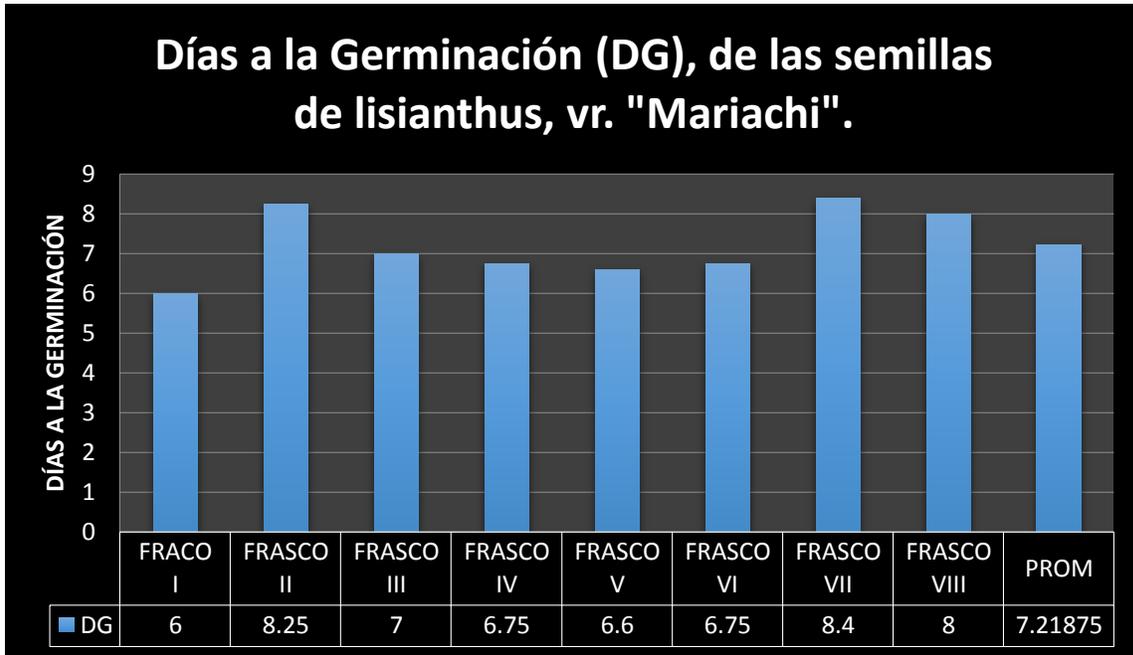


Figura 2. Días a la germinación (DG), en semillas de *lisianthus*, vr. "Mariachi".

c).- *Porcentaje de Contaminación (PC)*

En cuanto al porcentaje de contaminación obtenido fue del 0% (Figura 3), lo cual nos indica que la técnica de desinfección empleada fue bastante eficiente, así como la manipulación de los embriones dentro de la cámara de flujo laminar al momento de la siembra. Damiano (1989), propone un procedimiento de desinfección, el cual consiste en esterilizar las semillas al 1.5% de hipoclorito de sodio, durante 20 minutos, enjuagando dos veces con agua estéril y posteriormente se colocan las semillas en el medio de cultivo. Para nuestro estudio proponemos el siguiente procedimiento de desinfección: 1. Sumergir las semillas en agua jabonosa (3%), por 3 minutos, 2. Posteriormente sumergirlas en etanol (70%), por 30 segundos, 3. Pasarlas a una solución de hipoclorito de sodio (1.5%) por 15 minutos, 4. Darles tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar y 5. Realizar la siembra *in vitro*, en el medio de cultivo MS al 50%. Encontrándose que el medio MS (1962) al 50% de su concentración de sales, presenta una mejor germinación de acuerdo con este autor.

Porcentaje de Contaminación (% C), en las semillas de lisianthus vr. "Mariachi".

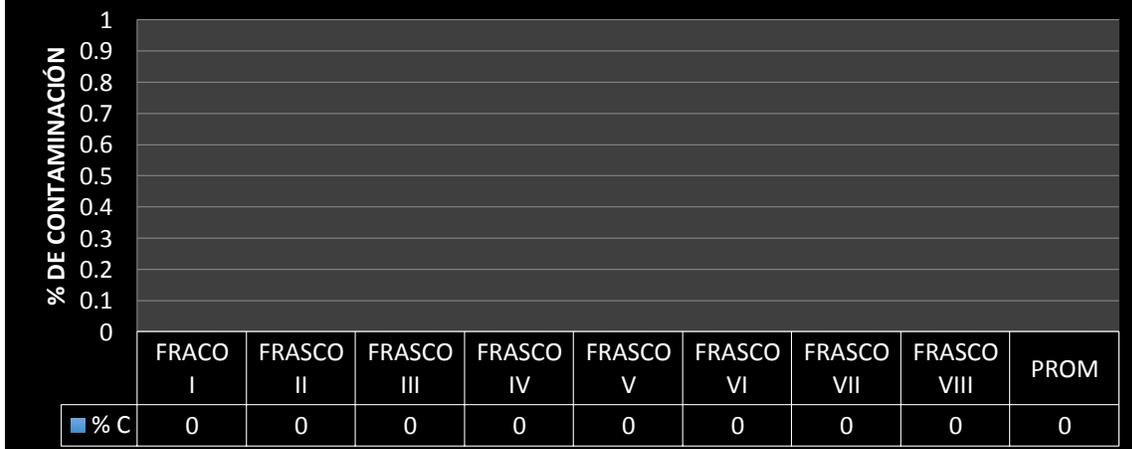


Figura 3. Porcentaje de Contaminación (%C), en semillas de lisianthus, vr. "Mariachi".

d).- Longitud de la plántula (LP)

A los 30 días de haber realizado la siembra del lisianthus, las plantas presentaron un promedio de (1.93 cm) de longitud, como se puede apreciar en la Figura 4. Plántulas completas (raíz, tallo y hojas), de color verde, sin presencia de deficiencias nutrimentales, con la capacidad de ser aclimatadas bajo condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad relativa adecuadas), como lo menciona Damiano (1989), una vez germinada las semillas en los primeros 6 días, las plántulas están listas para su aclimatación en tres semanas más. En comparación con la germinación convencional, donde esta etapa puede irse hasta 13 semanas, lo cual equivale a más de 60 días cuando las plántulas presentan 2 pares de hojas bien desarrolladas y un excelente sistema radicular, listas para ser trasplantadas a la cama previamente preparada. Lo cual concuerda con PanAmerican (2014), quien menciona que las plántulas se trasplantan en la cama de cultivo cuando tienen 4 hojas verdaderas, lo cual es importante trasplantar las plántula con un sistema de raíz activo y no demasiado profundo, para evitar problemas con pudriciones de tallo.

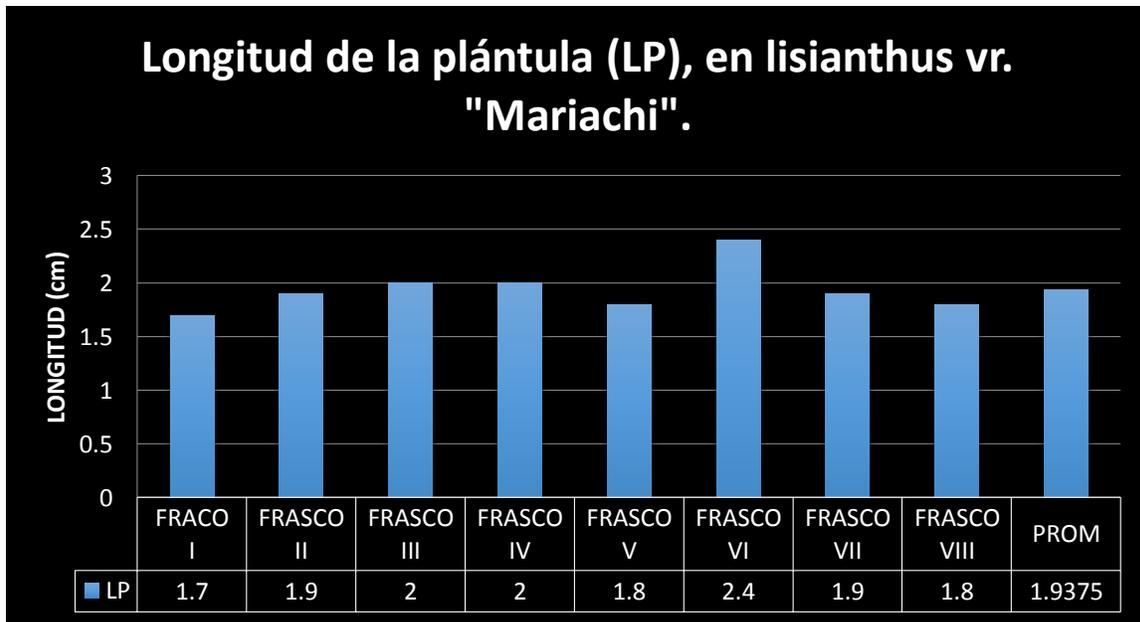


Figura 4. Longitud de la Plántula (LP), en lisianthus, vr. "Mariachi".

e).- Longitud de la Raíz (LR)

En cuanto a la longitud de raíz también se consideró a los 30 días de haber germinado las semillas, para este tiempo trascurrido las plántulas presentaron (Figura 5), un promedio de 1.425 cm de largo, presentando características como: raíces de color blanco, sin ramificaciones, de crecimiento tipo pivotante en el medio de crecimiento. En la gráfica se puede apreciar la longitud de las raíces y el promedio de estas.

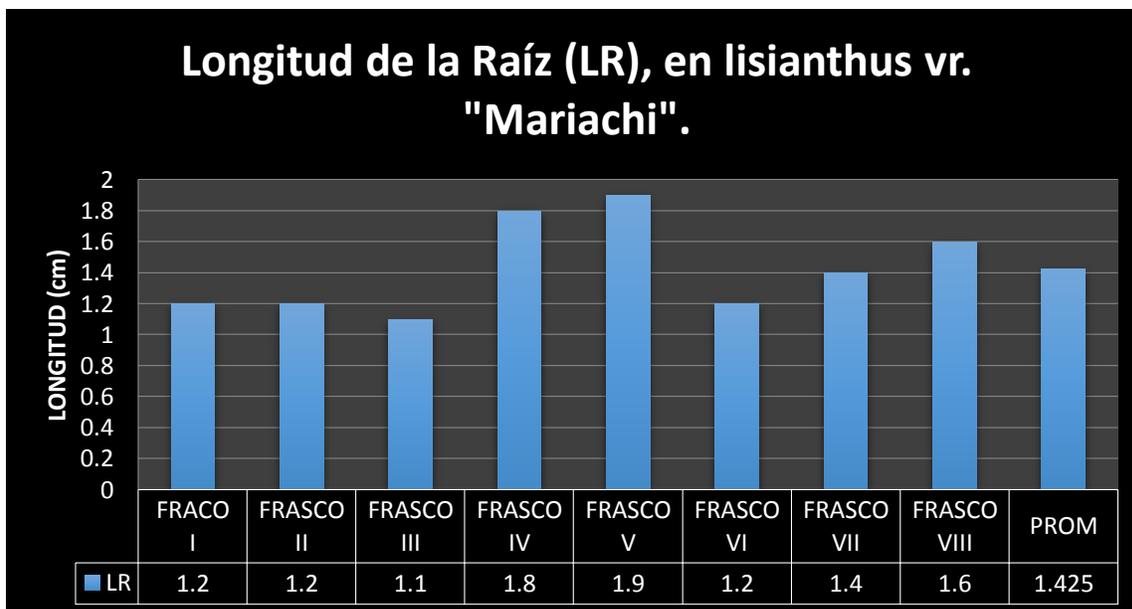


Figura 5. Longitud de la Raíz (LR), en *lisianthus*, vr. "Mariachi".

f).- *Número de Hojas (NH)*

Finalmente, en la Figura 6, se puede apreciar que a los 30 días, las plantas ya presentaban cuatro hojas o dos pares de hojas bien desarrolladas, las cuales estaban listas para ser aclimatadas o bien para transferirse a un medio de cultivo con ANA y BAP, para encontrar la concentración adecuada para la formación de brotes por cada explante. La producción de brote puede llevarse a cabo directamente del explante o del callo y esto dependerá de las hormonas suministradas (Hartman-Hudson et al. 1997). Por otra parte Vyscot y Jara (1984), mencionan que el uso de fragmentos de plantas jóvenes o de plantas germinadas *in vitro*, en las cuales debido a que su potencial morfogénico es mayor y por ende se reduce considerablemente la incidencia de contaminación tanto bacteria como por hongos. Lo cual se pudo constatar al transferir microesquejes de *lisianthus* a los diferentes tratamientos a evaluar, en donde también se obtuvo el mínimo de contaminación al ser transferidos.

En relación a la Figura 4, 5 y 6, podemos mencionar que las plántulas en 30 días estaban listas para ser aclimatadas, como se había comentado anteriormente ya que esto concuerda con Damiano (1989), el cual puede reducir tiempo en comparación con el sistema convencional como lo menciona Pergola, *et al.* (1992). Quien menciona que la siembra se realiza en charolas de plástico preparando un sustrato de peat moos y perlita todo esto debe de ser estéril, la semilla se cubre con una capa ligera de vermiculita. El sustrato debe de 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 lugares ventilados a una temperatura no menor a 15°C y no mayor de 27°C. Como hemos comentado anteriormente el tiempo puede ir hasta las 13 semanas, en comparación con el cultivo de tejidos que puede ir de los 30 días y conseguir un 80% de su

germinación o bien como menciona Alonso (2002), que es indispensable el uso de citocininas y auxinas para tener respuesta en los explantes y, manipulando la proporción de estos reguladores de crecimiento. Los explantes pueden formar plantas directamente, o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares (brotes y/o raíces), la micropropagación es una alternativa a la propagación convencional, ya que utiliza explantes como: yemas apicales o laterales, segmentos de hojas, segmentos de raíz y/o protoplastos, en condiciones asépticas, donde pueden controlar las condiciones como: luz, temperatura y nutrimentos. Dicha técnica desarrolla un sistema de propagación clonal masiva de material vegetal, libre de patógenos, con la subsecuente regeneración de nuevas plantas; también se ha centrado en la conservación de recursos genéticos de especies alimenticias, medicinales, forestales y ornamentales (Mazari y Rubluo 1984, Citado por Chávez y Rubluo 1995).

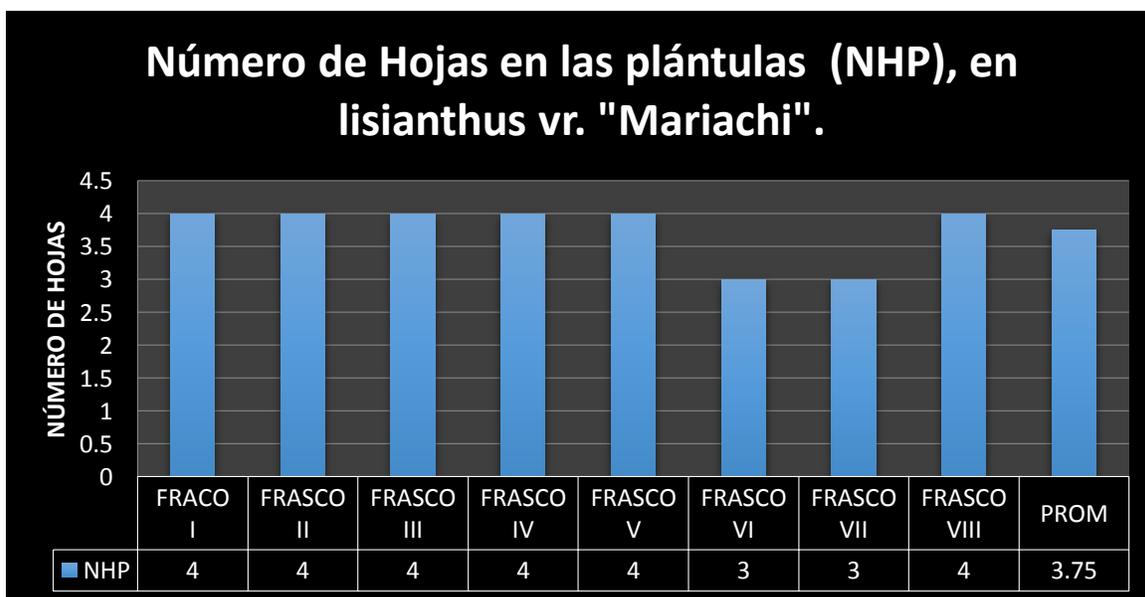


Figura 6. Número de Hojas en las Plántulas (NHP), en *lisianthus*, vr. "Mariachi".

El análisis para este primer experimento podemos mencionar que: 1).- la plántula que se produjo *in vitro* fue de buena calidad, ya que presentaba un buen color, buena raíz, plántula vigorosa, hojas bien definidas, las cuales facilitan la manipulación *in vitro* como explantes para incrementar el lote de planta *in vitro* para futuras aplicaciones (formación de brote, enraizamiento y aclimatación) y 2).- las condiciones para llevar a cabo una buena germinación son: temperatura, intensidad lumínica, el fotoperiodo, la humedad relativa y los nutrientes que presento el medio de cultivo en donde fueron depositadas cada una de las semillas, aunado a la calidad de la semilla que genéticamente fuera viable.

5.2. Experimento II. Formación de brotes

En cuanto a la segunda parte del trabajo experimental (formación de brotes), no se observó oxidación, ni vitrificación en ninguno de los tratamientos evaluados, para lo cual no fue motivo de truncar la investigación o hacer los ajustes pertinentes para esta etapa. Se consideraron 50 días para esta etapa, a partir de la transferencia y/o siembra del explante en cada uno de los tratamientos a evaluar.

5.2.1.- Longitud del brote (LB)

El análisis de varianza (ANOVA) obtenido para esta variable, indico que no existen diferencias significativas ($\alpha=0.01$) entre los tratamientos evaluados (Cuadro 5). El coeficiente de variación obtenido fue de 21.97877%.

Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable longitud del brote (LB) en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi.

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P>F
TRATAMIENTO	11	2.90016667	0.26365152	1.53	0.1463
ERROR	60	10.37163333	0.17286056		
TOTAL	71	13.27180000			
C.V %	21.97877				

Con la realización de la prueba de comparación de medias (Tukey), podemos observar un solo grupo de comparación de medias estadísticamente similares (Cuadro 6). Sin embargo, el tratamiento que mayor longitud de brote obtuvo, fue para el T₄ ANA (0.0) BAP (3.0); ya que dicho tratamiento suplementado con 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 3.0 mgL⁻¹ de BAP, respondió mejor a esta variable, obteniendo un promedio de 2.19 cm de longitud, seguido del tratamiento T₆ ANA (0.4) BAP (1.0) con 2.14 cm. Lo cual no ocurre para los tratamientos: T₅ ANA (0.4) BAP (0.0), T₂ ANA (0.0) BAP (1.0) y T₃ ANA (0.0) BAP (2.0), en donde se obtienen un promedio de longitud del brote de 1.68 cm, 1.66 cm y 1.47 cm, respectivamente. Como se puede apreciar en el Cuadro 6. En todos los casos la longitud de los brotes es estadísticamente igual, en el cual se le puede atribuir al efecto de BAP, en donde las dosis empleadas fueron altas, pero adecuadas para esta variable (NB), pero que para esta variable si repercute en el crecimiento (división celular), ya que dentro de las citocininas están: la Kinetina (KIN), la Bencilaminopurina (BAP), etc., las cuales funcionan como inductoras de crecimiento de brotes y represoras de la dominancia apical. Cada tipo de regulador, cada concentración, así como cada combinación de regulador dará respuesta de crecimiento distinto (Hurtado y Merino, 1988).

Cuadro 6. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable longitud de brote (LB) en lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Giseb.), variedad Mariachi.

TRATAMIENTO (mgL ⁻¹)	MEDIA
T ₄ ANA(0.0)BAP(3.0)	2.1950 a
T ₆ ANA(0.4)BAP(1.0)	2.1450 a
T ₇ ANA(0.4)BAP(2.0)	2.1150 a
T ₁₂ ANA(0.8)BAP(3.0)	1.9583 a
T ₈ ANA(0.4)BAP(3.0)	1.9517 a
T ₁₁ ANA(0.8)BAP(2.0)	1.9117 a
T ₉ ANA(0.8)BAP(0.0)	1.9083 a
T ₁ ANA(0.0)BAP(0.0)	1.8500 a
T ₁₀ ANA(0.8)BAP(1.0)	1.8333 a
T ₅ ANA(0.4)BAP(0.0)	1.6850 a
T ₂ ANA(0.0)BAP(1.0)	1.6683 a
T ₃ ANA(0.0)BAP(2.0)	1.4783 a

Los promedios seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren significativamente a un nivel de probabilidad del 0.05%.

En la gráfica podemos apreciar (Figura 7), los resultados, en donde podemos constatar que el mejor tratamiento fue el T₄ ANA (0.0) BAP (3.0), en donde se obtuvo la mayor longitud de brotes (cm). A pesar de que estadísticamente todos los tratamientos son similares, este tratamiento obtuvo un promedio de 2.19 cm de longitud; seguidos de los tratamientos: T₆ ANA (0.4) BAP (1.0), T₇ ANA (0.4) BAP (2.0) con un promedio 2.14 cm y 2.11 cm de longitud. En comparación con la longitud promedio del brote que se obtuvo en el T₃ ANA (0.0) BAP (2.0), el cual fue de 1.4 cm en promedio de longitud, siendo inferior inclusive al testigo T₁ ANA (0.0) BAP (0.0), con 1.85 centímetros de longitud.

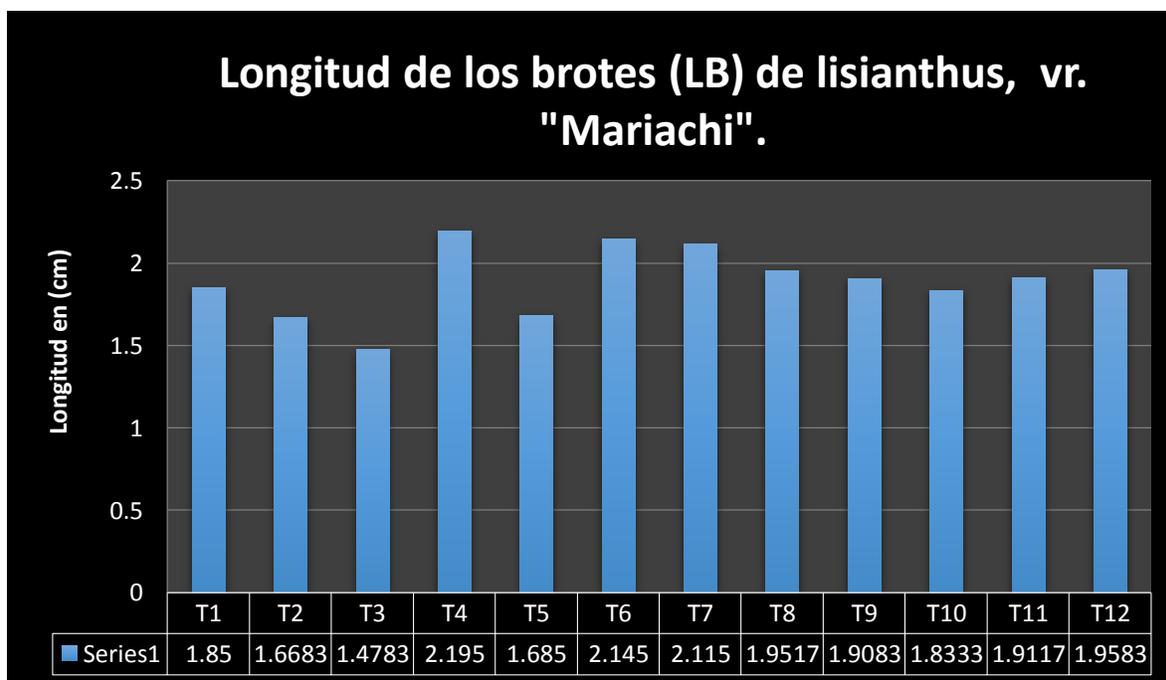


Figura 7. Efecto de los tratamientos en la longitud de los brotes (LB) en lisianthus vr. "Mariachi".

5.2.2.- Diámetro del Brote (DB)

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), para esta variable indico que existen diferencias significativas ($\alpha=0.01$) entre los tratamientos evaluados (Cuadro 7). El coeficiente de variación fue del 28.02783%.

Cuadro 7. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable diámetro del brote (DB) en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi.

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P>F
TRATAMIENTO	11	0.09538194	0.00867109	3.68	0.0005
ERROR	60	0.14138333	0.00235639		
TOTAL	71	0.23676528			
C.V %	28.02783				

Con la prueba de comparación de medias (Tukey) evaluada podemos observar (Cuadro 8), que se forman tres grupos estadísticamente, en donde los tratamientos suplementados con .4 y/o .8 mgL^{-1} de ANA y 0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mgL^{-1} de BAP, se obtuvieron promedio de .2016 cm, .1950 cm, .1933 cm, .1716 cm, .1700 cm y .1700 cm de diámetro, los cuales corresponden a los tratamientos: T₁₁ ANA (0.8) BAP (2.0), T₈ ANA (0.4) BAP (3.0), T₁₂ ANA (0.8) BAP (3.0), T₉ ANA (0.8) BAP (0.0), T₁₀ ANA (0.8) BAP (1.0) y T₆ ANA (0.4) BAP (1.0), en cuanto a un segundo grupo tenemos a los siguientes tratamientos: T₇ ANA (0.4) BAP (2.0), T₃ ANA (0.0) BAP (2.0), T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), T₅ ANA (0.4) BAP (0.0) y T₁ ANA (0.0) BAP (0.0), con promedio de diámetros de .1650 cm, .1616 cm, .1450 cm, .1266 cm y .1166 cm, en donde podemos observar, que las dosis empleadas de BAP fueron de 0.0 A 2.0 mgL^{-1} en combinación con el ANA (0.0 A 0.4 mgL^{-1}), no presentaron ningún efecto en cuanto al diámetro del brote, para cual si ocurrió para el tratamiento T₄ ANA (0.0) BAP (3.0), en donde se obtuvo un promedio de .2616 mm de diámetro al suplementarle 0.0 mgL^{-1} de ANA y 3.0 mgL^{-1} BAP, siendo este el mejor tratamiento para esta variable en comparación con el resto de los tratamientos evaluados, que se describe como un tercer grupo.

Cuadro 8. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable diámetro (DB) del brote en lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Giseb.), variedad Mariachi.

TRATAMIENTO (mgL ⁻¹)	MEDIA
T ₄ ANA(0.0)BAP(3.0)	0.26167 a
T ₁₁ ANA(0.8)BAP(2.0)	0.20167 ab
T ₈ ANA(0.4)BAP(3.0)	0.19500 ab
T ₁₂ ANA(0.8)BAP(3.0)	0.19333 ab
T ₉ ANA(0.8)BAP(0.0)	0.17167 ab
T ₁₀ ANA(0.8)BAP(1.0)	0.17000 ab
T ₆ ANA(0.4)BAP(1.0)	0.17000 ab
T ₇ ANA(0.4)BAP(2.0)	0.16500 b
T ₃ ANA(0.0)BAP(2.0)	0.16167 b
T ₂ ANA(0.0)BAP(1.0)	0.14500 b
T ₅ ANA(0.4)BAP(0.0)	0.12667 b
T ₁ ANA(0.0)BAP(0.0)	0.11667 b

Los promedios seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren significativamente a un nivel de probabilidad del 0.05%.

En la siguiente grafica (Figura 8), se representa gráficamente los resultados antes mencionados. En donde se puede constatar que el tratamiento suplementado con 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 3.0 mgL⁻¹ BAP, fue el que mostro el mayor diámetro del brote producidos con un promedio de (.2616 mm); este es el T₄ ANA (0.0) BAP (3.0), mientras que el peor tratamiento fue el que se le suplemento 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 0.0 mgL⁻¹ BAP, ya que solo produjo un promedio de 0.1166 mm, siendo este último el tratamiento testigo T₁ ANA (0.0) BAP (0.0).

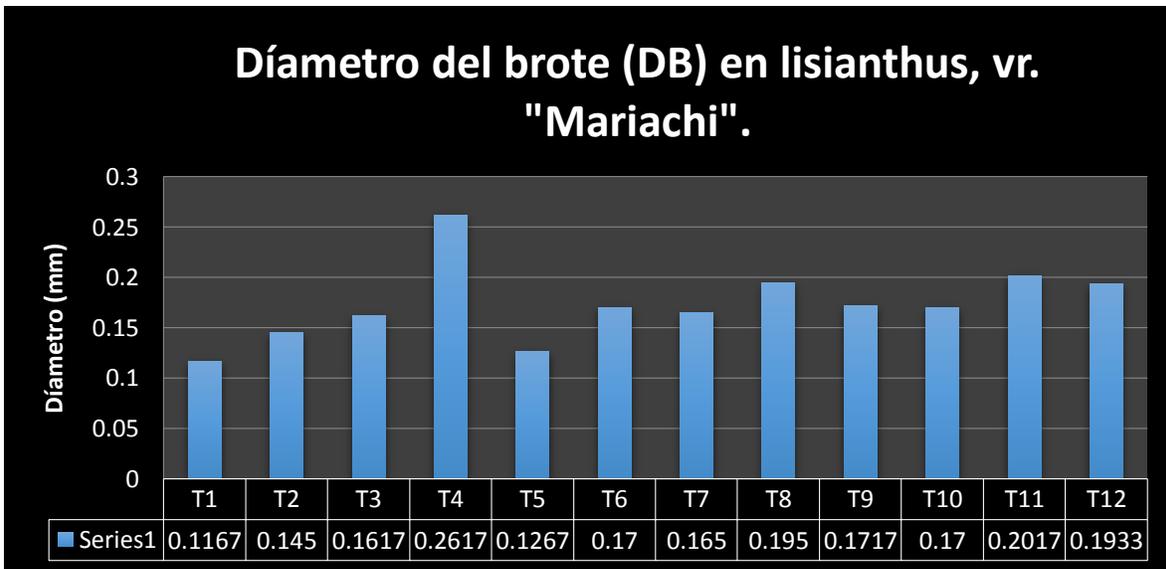


Figura 8. Efecto de los tratamientos en relación al diámetro de los brotes (DB) en lisianthus vr. "Mariachi".

5.2.3.- Número de Brotes (NB)

Con lo que respecta a esta variable el análisis de varianza (ANOVA) evaluada, indico que existen diferencias significativas ($\alpha=0.01$) entre los factores considerados (Cuadro 9), para la variable (NB). En cuanto al coeficiente de variación obtenido fue de 36.68092%.

Cuadro 9. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable número de brotes (NB) en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi.

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P>F
TRATAMIENTO	11	657.4444444	59.7676768	17.38	<.0001
ERROR	60	206.3333333	3.4388889		
TOTAL	71	863.7777778			
C.V %	36.68092				

Con la prueba de comparación de medias de Tukey empleada, podemos observar (Cuadro 10) que estadísticamente se conforman 9 grupos de medias. Estadísticamente el mejor tratamiento fue el T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), ya que este tratamiento suplementado con 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 1.0 mgL⁻¹ de BAP, fue el que obtuvo el mayor número de brotes (12.50 brotes/promedio). Seguido del tratamiento T₆ ANA (0.4) BAP (1.0), con un promedio de 8.167 brotes, mientras que los peores tratamientos fueron T₅ ANA (0.4) BAP (0.0) y T₁ ANA (0.0) BAP (0.0), con promedios de 1.833 y 1.00 brotes respectivamente. La producción de brotes puede llevarse a cabo directamente del explante o del callo y esto dependerá de las hormonas suministradas (Hartman-Hudson et al. 1997). De acuerdo con Hurtado y Merino (1988), El término reguladores de crecimiento se aplica a las hormonas vegetales sintéticas, y estas forman parte de la mayoría de los medios de cultivo. Básicamente se utilizan dos: las auxinas y las citocininas, las primeras se utilizan en un rango de 0.1 a 10 mg/L, mientras que las segundas van de 0.3 a 30 mg/L. De acuerdo con Griesbach (1987), el grado de ramificación basal de los microesquejes va de 2 a 5 por tallo principal, quizá por la alta concentración de citocininas utilizadas durante el cultivo (3 miligramos por litro de benziladenina), ya que se sabe que las citocininas tienen la capacidad de inducir la ramificación basal al aplicarse exógenamente a las plantas cultivada *in vitro*; aún la ramificación de los esquejes puede verse afectado por varios meses después de haberse removido del cultivo *in vitro*, ya que se induce brotación lateral al romper su dormancia e influir posteriormente en el hábito de crecimiento de la planta, aunque también influye esto, la luz, temperatura y la nutrición que se le provea al cultivo. Para nuestro caso al revisar los tratamientos, podemos decir que al realizar combinaciones de ANA y BAP, en concentraciones 0.0 mgL⁻¹ y 1.0 y 2.0 de BAP, se obtienen resultados más altos en comparación con los resultados obtenidos por los autores, ya que dichos resultados también los obtuvimos en la concentración reportada por ellos mismos.

Cuadro 10. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable número de brotes (NB) en *Iisianthus (Eustoma, grandiflorum Giseb.)*, variedad Mariachi.

TRATAMIENTO (mgL ⁻¹)	MEDIA
T ₂ ANA(0.0)BAP(1.0)	12.500 a
T ₆ ANA(0.4)BAP(1.0)	8.167 b
T ₃ ANA(0.0)BAP(2.0)	6.667 bc
T ₁₀ ANA(0.8)BAP(1.0)	5.833 bcd
T ₁₁ ANA(0.8)BAP(2.0)	5.500 bcd
T ₄ ANA(0.0)BAP(3.0)	5.167 bcde
T ₇ ANA(0.4)BAP(2.0)	5.000 bcde
T ₈ ANA(0.4)BAP(3.0)	4.000 cdef
T ₁₂ ANA(0.8)BAP(3.0)	2.667 def
T ₉ ANA(0.8)BAP(0.0)	2.333 def
T ₅ ANA(0.4)BAP(0.0)	1.833 ef
T ₁ ANA(0.0)BAP(0.0)	1.000 f

Los promedios seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren significativamente a un nivel de probabilidad del 0.05%.

En la figura 9, se representa gráficamente estos resultados. En esta podemos observar, que el tratamiento T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), fue el que produjo el mayor número de brotes (12.50) en comparación con el resto de los tratamientos evaluado, si se compara los tratamientos en donde se les fue suplementado de 1.0 a 2.0 mgL⁻¹ de BAP y 0.0 y .4 mgL⁻¹ de ANA, se puede observar que fueron los que produjeron una mayor cantidad de brotes considerables T₆ ANA (0.4) BAP (1.0) T₃ ANA (0.0) BAP (2.0), para lo cual no ocurrió cuando las cantidades son invertidas 0.0 mgL⁻¹ de BAP y 0.0 y .8 mgL⁻¹ de ANA, como se puede constatar para el caso de los tratamientos: T₉ ANA (0.8) BAP (0.0) T₅ ANA (0.4) BAP (0.0) y T₁ ANA (0.0) BAP (0.0), respectivamente. Siendo este último el tratamiento con el menor número de brotes emitidos. Durante la etapa de multiplicación, el principal objetivo es la de proporcionar la mayor cantidad de brotes a través de los subcultivos sucesivos a partir de meristemas (Debergh, 1990). Por lo general, el medio de cultivo es similar al de la fase de establecimiento y es común utilizar citocininas con el propósito de estimular la división celular e inhibir la dominancia apical para lograr el crecimiento de brotes (Azcon y Talon, 2001).

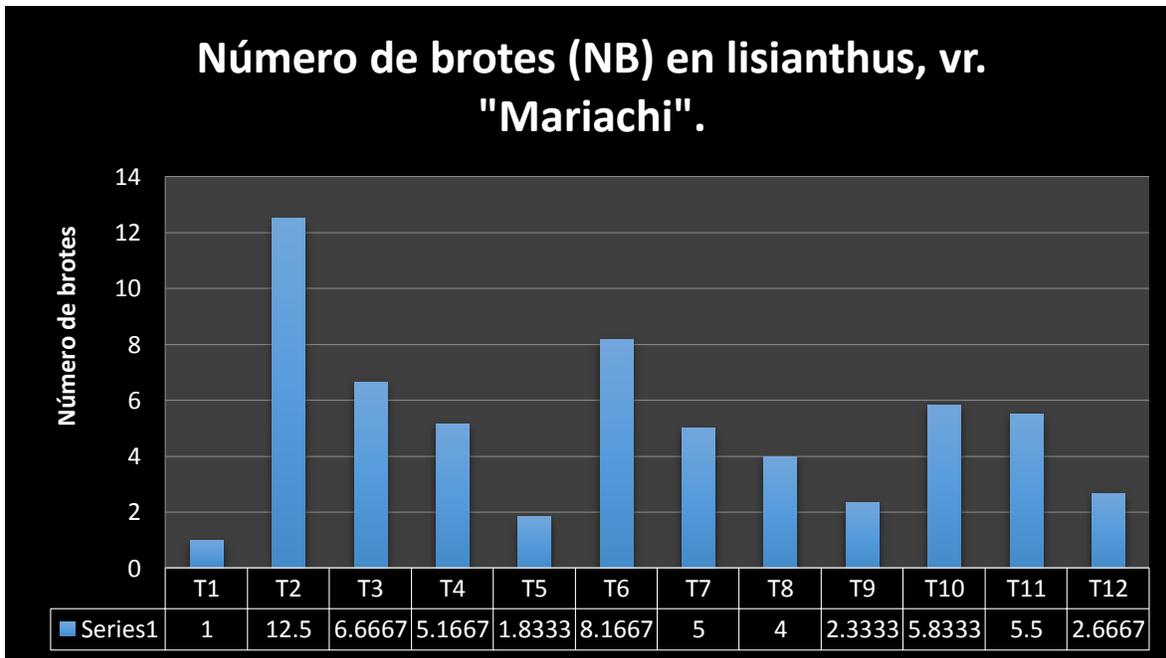


Figura 9. Efecto de los tratamientos en relación al número de brotes (NB) en lisianthus vr. "Mariachi".

Los resultados obtenidos demuestran que se obtuvo una media de 12.5 brotes por explante en el tratamiento T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), si comparamos el tratamiento T₈ ANA (0.4) BAP (3.0), en donde dicho tratamiento fue suplementado 0.4 mgL⁻¹ de ANA 3.0 mgL⁻¹ de BAP, obteniendo un promedio de 4.0 de brotes en lisianthus; con lo reportado por Mendoza y Muñoz (1994), quienes propagaron *in vitro* a *Gypsophilia paniculata* y en la fase de multiplicación utilizaron un medio suplementado con 0.5 mgL⁻¹ de ANA 3.0 mgL⁻¹ de BA obteniendo ocho brotes por explante, dentro de cinco semanas. En donde podemos decir que a dosis de 1.0 a 2.0 mgL⁻¹ de BAP y de 0.0 a 0.4 mgL⁻¹ de ANA, se puede incrementar el número (6.667 a 12.500) de brotes por explante en promedio, mientras que en combinaciones de 0.0 a .8 mgL⁻¹ de ANA y de 1.0 a 0.3 mgL⁻¹ de BAP, el número de brotes en promedio es menor a 5.8 brotes Cuadro 10 y Figura 9.

5.2.4.- Número de Hojas por Brote (NHB)

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño completamente al azar, indica que para esta variable (NHB), mostro que presenta diferencias significativas, obtenido un coeficiente de variación del 34.03718%, el cual se puede apreciar en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Análisis de varianza (ANOVA), para la variable número de Hojas por brote (NHB) en lisanthus (*Eustoma grandiflorum* Giseb), variedad Mariachi.

F.V	G.L	S.C	C.M	F	P>F
TRATAMIENTO	11	220.8643611	20.0785783	4.64	<.0001
ERROR	60	259.6201000	4.3270017		
TOTAL	71	480.4844611			
C.V %	34.03718				

En cuanto a la prueba de comparación de medias (Tukey), el cual señala las diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados para la variable (NHB), en donde también se puede apreciar que se forman tres grupos. Sin embargo, el mejor tratamiento para esta variable fue el T₁₂ ANA (0.8) BAP (3.0), con un promedio de 8.915 hojas por brote. Los tratamientos: T₇ ANA (0.4) BAP (2.0), T₈ ANA (0.4) BAP (3.0), T₆ ANA (0.4) BAP (1.0), T₃ ANA (0.0) BAP (2.0), T₁₀ ANA (0.8) BAP (1.0) y T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), en los cuales se obtuvieron promedios de: 7.552, 5.552, 5.837, 5.400, 5.118, 5.102 y 5.053 en cuanto al número de hojas producidos por brote. Sin embargo el peor tratamiento fue el: T₅ ANA (0.4) BAP (0.0), seguido del T₁ ANA (0.0) BAP (0.0), con valores de 3.472 y 4.000 respectivamente.

Cuadro 12. Comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variable número de hojas por brote (NHB) en lisanthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.), variedad Mariachi.

TRATAMIENTO (mgL ⁻¹)	MEDIA
T ₁₂ ANA(0.8)BAP(3.0)	8.915 a
T ₄ ANA(0.0)BAP(3.0)	8.672 a
T ₁₁ ANA(0.8)BAP(2.0)	8.373 a
T ₇ ANA(0.4)BAP(2.0)	7.552 ab
T ₈ ANA(0.4)BAP(3.0)	5.843 ab
T ₆ ANA(0.4)BAP(1.0)	5.837 ab
T ₉ ANA(0.8)BAP(0.0)	5.400 ab
T ₃ ANA(0.0)BAP(2.0)	5.118 ab
T ₁₀ ANA(0.8)BAP(1.0)	5.102 ab
T ₂ ANA(0.0)BAP(1.0)	5.053 ab
T ₁ ANA(0.0)BAP(0.0)	4.000 b
T ₅ ANA(0.4)BAP(0.0)	3.472 b

Los promedios seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren significativamente a un nivel de probabilidad del 0.05%.

En la figura 10, se puede apreciar y constatar que el mejor tratamiento para la variable número de hojas por brote (NHB), fue para el tratamiento T₁₂ ANA (0.8) BAP (3.0), seguido de los tratamientos T₄ ANA (0.0) BAP (3.0) y T₁₁ ANA (0.8) BAP (2.0) ya que se obtuvo un promedio de 8.915 hojas por brote, mientras que el peor tratamiento fue para el T₅ ANA (0.4) BAP (0.0), con un valor de 3.472 hojas por brote.

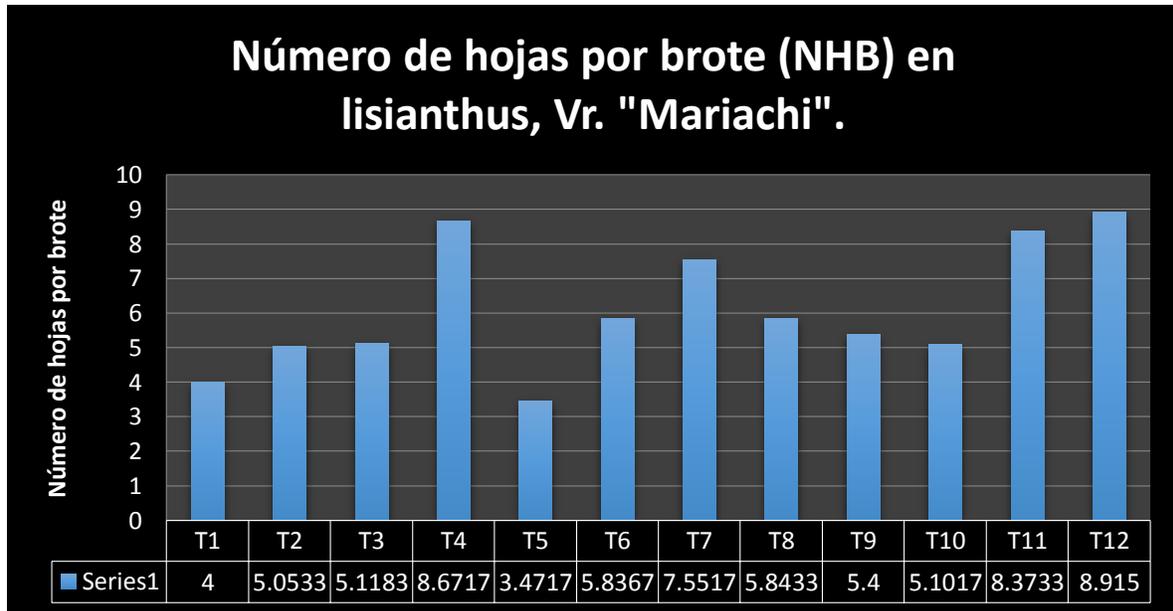


Figura 10. Efecto de los tratamientos en relación al número de hojas por brote (NHB) en lisianthus vr. Mariachi.

VI.- CONCLUSIONES

Dentro de las conclusiones a las que se llegó en la presente investigación, se tiene las siguientes:

1.- Experimento I. Germinación y desarrollo de las semillas

1. La técnica de desinfestación utilizada en la presente investigación fue favorable, ya que no hubo contaminación en ninguno de los tratamientos, correspondiente a la etapa de germinación y multiplicación.
2. El medio utilizado (MS 50%) y la técnica de desinfestación propuestas proporcionaron un 92.5% de germinación de semillas de *lisianthus* en la variedad Mariachi "Pure White" germinado con una media de 7.21 días, bajo condiciones de una intensidad lumínica de 2700 a 3400 lux, con un fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de 28°C durante el día y 18 °C por la noche, obteniéndose durante esta etapa el 0% de contaminación durante la germinación de las semillas *in vitro* de esta especie a evaluar.
3. Con lo que respecta a desarrollo de plántula *in vitro*, el número de hojas (4 hojas) apareció a los 30 días de haberse germinado las semillas, mostrando una buena raíz (1.42 cm) y una longitud de la plántula (1.93 cm); características fenotípicas idóneas para aclimatarse y/o inducir producción de brotes para incrementar el lote *in vitro* y de esta manera formar plántulas a partir de los explantes que serán enraizados en medios de cultivos adecuados prediseñados para esta etapa.

2.- Experimento II. Formación de brotes

1. El mejor tratamientos para la variable longitud de brotes fue T₄ ANA (0.0) BAP (3.0), con un promedio de 2.1950 cm por brote.
2. Para el grosor del bote (diámetro), la concentración óptima fue 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 3.0 mgL⁻¹ de BAP, en donde se obtuvo un promedio de 0.26167 mm por brote, en dicho tratamiento evaluado.

3. Con respecto al número de brotes por explante se tiene que el mejor tratamiento fue el T₂ ANA (0.0) BAP (1.0), con un promedio de 12.500 brotes, es decir que si al medio lo suplementado con 0.0 mgL⁻¹ de ANA y 1.0 mgL⁻¹ de BAP, podemos obtener estos resultados.
4. El número de hojas por brote, que se obtuvo fue en promedio de 8.915, siendo el mejor tratamiento el T₁₂ ANA (0.8) BAP (3.0), ya que fue el tratamiento donde se presentó brote de color verde más intenso.
5. Con esta técnica se logra disminuir el tiempo que conlleva la germinación, en comparación con la propagación convencional aunado a que se puede incrementar masivamente la producción en menor superficie.

VII.- RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se pueden hacer a la presente investigación destacan las siguientes:

1. Continuar con la multiplicación del material *in vitro*, para identificar la tasa de multiplicación para esta variedad.
2. Evaluar y encontrar el medio adecuado para realizar el enraizamiento *in vitro* para esta variedad en estudio.
3. Realizar la aclimatación de las plantas multiplicadas bajo esta técnica, para conocer el porcentaje de merma que se puede obtener durante la aclimatación y el endurecimiento de la misma, realizando los ajustes pertinentes en esta etapa.
4. Evaluar otras variedades y/o series con los tratamientos previamente evaluados para encontrar respuestas específicas entre medios y variedades, a variables como: producción de brotes, longitud de brote, tiempos de enraizados, tasa de multiplicación, entre otras variables a considerar.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Acram, M. T.; R.R. Williams and W.H. Sheather. 1996. Comparative Anatomy of four Australian rare plants grow *in vitro*. Botanic Garden Micropropagation News. 2 (2).
2. Alonso, G. M. 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *Perlagonium*. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. 22-35 p.
3. Anónimo, 1984. Hints for succesful growing of *lisianthus rusellianus* F1 Hybrid "Yodel Series". Sakata. Yokohama, Japan.
4. Asen, S. *et al.* 1986. Flavonoides from *Eustoma grandiflorum* flowers petals. In Phytochemistry Belstville Agricultural Research Center, USDA. Belstville, USA. 25 (11): 2509-2513.
5. Azcon-Bieto, J; M, Talon. 2001. Fundamentos de Fisiología Vegatal. Mc. Graw-Hill. Interamericana. España. P.522.
6. Camargo, M. S. Chimizu, L. K. Saito, M. A. Kameoka, C. H, Mello, S. C y Carmello, Q. A. C. 2004. Crecimiento e absorção de nutrientes pelo lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivao em solo. Horticultura Brasileira 22 (1): 143-146.
7. Chávez, V.M.A y Rubluo, A. L. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. In: Linares. E; Davila, P; Bye. R y Elias. Ts. (eds). Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM, México. 123-131 p.
8. Conquist, A. 1982. An integrated system of clasification. Columbia. University Press. N.Y. USA. 23 p.
9. Corr, B. Y Katz, P. 1997. A grower's guide to lisianthus production. Floracultura Intenational 7: 16-20.
10. Damiano, C. *et al.* 1986. *In vitro* propagation of *lisianthus rusellianus* hook. Annali dell' Instituto sperimentale per la floriculture. Instituto Sperimentale per la floricultura. San Remo, Italia. 17 (1): 105-113

11. Damiano, C; Ruffoni, B. *et al.* 1989. Tissue culture and micropropagation of *Lisianthus russellianus*, Giseb) to spacing, proving and nitrogen application rate under plastic tunnel protection. *Acta Horticulturae* 246. 237-246.
12. Debbie H. 2003. *Ball Redbook. Crop Production*. 17Th Edición. Ed. Ball Publishing. Batavia Illinois. E.U. A. P. 655-657.
13. Debergh, P.C.; Read, P. E. 1990. Micropropagation. In *Micropropagation: Tecnology and Aplication*. Ed. Debergh, P.C y R. H. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. p. 479.
14. Domínguez, R. A. 2008. Cultivo del lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Ponencias Flores de Altura. A.M. Arteaga, Coahuila.10 p.
15. Domínguez, R.A. 2002. El cultivo del Lisianthus. Flores de Altura. Saltillo, Coahuila. Boletín. P. 2-12.
16. Evans N. E. 1990. Micropropagación. In: Pollard, J. W y Walter, J. M. (eds). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 6. *Plants Cell and Tissue Culture*. Humana Press. New Jersey. 93-102 p.
17. Evanthia. 2017. Evanthia seeds & plants. Vlotlaan 560, 2681 TX Monster. The Netherlands. P. 12-14.
18. Fischer, G.; Zimmer, K., 1987. Multiple shoot formation from *in vitro* germinated seeds. *Gartenbauwissenschaft*. Institut für Zierpflanzenbau der Universität. Hannover, RFA. 52 (3): 153-140.
19. Fox, R. 1998. Lisianthus a specialty cut flowers. *Practical Hydroponics and Greenhouses*. Ed. Wiley. Jhon and Sons. USA. P. 43-51.
20. García, E.1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen*, Instituto de geografía. UNAM. México. D.F. 96 p.
21. García, F. L. A. 1998. Guía para el cultivo de lisianthus (*Eustoma grandiflora* Rat). Dirección de Apoyo Técnico y Divulgación. Conjunto SEDAGRO, Metepec, Estado de Mexico. P. 12.
22. Gloeckner. 2017. Gloeckner flowers seeds, foliage and vegetables catalog. Fred C. Gloeckner & Co. Inc. 550 Mamaroneck Avenue Harrison, New York. U.S.A. P. 68-69.

23. Grattapaglia, D.; Machado, M. A. Micropropagação. In Torres, A. C.; Caldas, L.S.; Buso, J. A (Ed). 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 183-260.
24. Griesbach, R. J *et al.* 1987. Tissue culture in the improvement of *Eustoma*. In Hortscience 23 (8): 4-8. USA.
25. Halevy, H. A; M. Kofranck, A. 1984. Evaluation of *lisianthus* as a new flower crop. In Hortscience. USA. 19 (6): 845-847.
26. Han, B. H.; Joung, H. Y; Choi, J. K.; Paek, K, Y. 1995. Effects of sealing materials and relative humidity of culture vessels on growth vitrification and nutrient contents *in vitro* plantlets of *Gypsophilia paniculata* L. "Bistol Fairy". Journal of Korean Society for Horticultural Science. V. 36. NO. 6. P. 886-892.
27. Han, B. H.; Joung, H. Y; Choi, J. K.; Paek, K, Y. 1996a. Effects of sealing materials on Co₂ and ethylene concentration in culture vessel, and growth and vitrification of *Gypsophilia paniculata* L. "Bistol Fairy". Journal of Korean Society for Horticultural Science. V. 37. NO. 1. P. 118-122.
28. Han, S.; Qi, L. K.; Wei, Y.; Yang, Y.; Zhang, Y. 1996b. Tissue culture and *in vitro* propagations of *Gypsophila paniculata*. Acta Horticulturae Sinica, Taigu, V. 23. No.2. P. 175-178.
29. Hartman-Hudson, T., Kester-Dale E., Davies-Fred T. Jr., and Geneve-Robert L. O. 1997. Plant Propagation: Principles and practices. Prentice Hall Editions. Sixth Edition. 564-570 p.
30. Heywood, V. H. 1985. Las plantas con flores. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España. P.219-220.
31. Hurtado M. D y Merino, E. M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México D.F. P. 94-95.
32. Jiménez, A. P. 1990. Producción industrial de plantas en maceta. 1ra. Ed. Horticultura. SI. Editor. Barcelona, España. P. 427-428.
33. Jiménez-González E. A. 1998. Generalidades el cultivo *in vitro*. In: Pérez-Ponce, JN. (Ed). Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de plantas. Cuba. 13-42 p.

34. Klingama, L. G. 1987. New potential floral culture for Arkansas. In Arkansas Farm Research. . USA. 32 (6): 9.
35. Leguizamo, S. G. 2006. Evaluación de preservadores comerciales en la vida poscosecha del Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*, Giseb.). cv. Mariachi. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Mexico. P. 14-16.
36. Manzueta, P. De la Riva, F. Y Urrestarazu, M. 2007. Cultivo de lisianthus en perlita. Plantaflor. 124: 92-94.
37. Melgares, A. 1996. El cultivo del lisianthus. Consejera del Medio Ambiente, Agricultura y Agua, comunidad Autónoma de la región de Murgia. Alhama de Murgia, España. P. 18.
38. Mendoza, M. G. 2007. Propagación *in vitro* de *Astrophytum oornatum* (De Canolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Tesis de Licenciatura. 87 p.
39. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
40. Nau, J. 1958. Ball Culture Guide. The Enciclopedia of Seed Germination 3ra Edition. Ball Publishing. Batavia Illinois. USA. 134 – 135 p.
41. PanAmerican Seed. (2012). Catálogo de semillas de ornato. P. 79.
42. PanAmerican Seed. (2014). Guía de Información de productos de semilla. P. 30-31.
43. Pergola G.: Oggiano N.: Curir P. 1992. Efects of seed and seedlings temperature conditions on planting, boletin and flowering in *Eustoma russellianum*. Scientia. Horticulturae. No.314. P. 173-177.
44. Pierik, R. I. M. 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3rd Ed. Editorial. Mundi-Prensa, Madrid. P 326.
45. Roh, M. S. and R. Lawson, H. 1984. The lure of *lisianthus*. Greenhouses manager. USA. 2: 103-121.

46. Schaeffer, W.I. 2003. Terminology Associated with Cell, Tissue and Organ Culture, Molecular Biology and Molecular Genetics, *in vitro* Cell Development Biology. 26: 97-101.
47. Semeniuk, P. 1987. *In vitro* propagations of Prairie gentian. In Plant cell, Tissue and organ culture 8: 249-253. USA.
48. Sharp *et al.* 1984. Handbook of plant cell culture. Ma. Millan Publishing Co. New York, U.S.A. Vol. II. pp. 119-120. Vol. III. pp. 398-399.
49. Tjia, B. and Sheehan, T. J., 1986. Chemical height control of *lisianthus rusellianus*. In, Hortscience. USA. 21 (1): 147-148.
50. Torres, H. G. 2011. Etiología de la secadera de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) en Texcoco, México y la evaluación de su control *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 73 p.
51. Venning D, F. 1992. Flores silvestres 1ª Edición. Editorial Trillas. Mexico, D.F. P. 182-187.
52. Vyscot, J. y Jára Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 59 (3): 449-452.
53. Yeoman, M. M. 1986. Plant cell culture technology. Blackwell Scientific. Oxford. Publications. Great Britain. P. 70-95.

IX.- ANEXOS

1	1	1.9	0.1	1	4	2
1	2	1.7	0.2	1	4	2
1	3	1.8	0.1	1	4	2
1	4	1.7	0.1	1	4	2
1	5	1.9	0.1	1	4	2
1	6	2.1	0.1	1	4	2
2	1	1.71	0.13	13	6.23	1
2	2	1.55	0.14	14	4.92	1
2	3	1.48	0.15	13	4.84	1
2	4	1.71	0.2	13	5.15	1
2	5	1.64	0.11	13	4.07	1
2	6	1.92	0.14	9	5.11	1
3	1	1.82	0.21	8	5.62	1
3	2	1.6	0.17	7	7	1
3	3	1.65	0.21	7	5.28	1
3	4	0.92	0.1	5	3.6	1
3	5	1.55	0.18	6	4.5	1
3	6	1.33	0.1	7	4.71	1
4	1	2.75	0.3	4	9.25	1
4	2	2.38	0.3	5	13	1
4	3	1.73	0.2	8	6.62	1
4	4	2.55	0.31	6	8.83	1
4	5	2.3	0.26	5	10	1
4	6	1.46	0.2	3	4.33	1
5	1	1.4	0.1	1	4	1
5	2	1.96	0.16	3	1.33	1
5	3	1.8	0.2	1	4	1
5	4	1.65	0.1	2	3.5	1
5	5	1.4	0.1	2	3.5	1
5	6	1.9	0.1	2	4.5	1
6	1	1.97	0.13	10	5.6	1
6	2	2.23	0.15	9	5.77	1
6	3	1.96	0.12	5	5	1
6	4	2.47	0.2	8	5.75	1
6	5	2.12	0.17	7	7	1
6	6	2.12	0.25	10	5.9	1
7	1	3	0.3	1	14	1
7	2	1.98	0.12	7	6.85	1
7	3	2.34	0.14	5	6.8	1
7	4	2.57	0.22	4	8	1
7	5	1.74	0.11	10	5	1
7	6	1.06	0.1	3	4.66	1
8	1	2.1	0.27	4	8	1

8	2	1.9	0.16	3	6.66	1
8	3	1.72	0.22	4	4.5	1
8	4	2	0.18	5	6.4	1
8	5	1.87	0.17	4	4.5	1
8	6	2.12	0.17	4	5	1
9	1	3.5	0.2	1	12	2
9	2	2.24	0.2	5	4.4	1
9	3	1.75	0.2	2	4	1
9	4	1.5	0.2	1	4	1
9	5	1	0.1	2	4	1
9	6	1.46	0.13	3	4	1
10	1	1.35	0.15	2	3.5	1
10	2	2.61	0.23	6	6.33	1
10	3	1.85	0.17	12	6.08	1
10	4	1.5	0.2	2	3.5	1
10	5	1.58	0.12	5	3.2	1
10	6	2.11	0.15	8	8	1
11	1	1.54	0.12	7	5	1
11	2	2.2	0.2	4	10	1
11	3	1.75	0.12	7	6.28	1
11	4	2.13	0.26	6	8.16	1
11	5	1.9	0.26	5	10.8	1
11	6	1.95	0.25	4	10	1
12	1	2.2	0.2	2	5.5	1
12	2	1.9	0.2	2	11	1
12	3	2.22	0.2	4	8.5	1
12	4	1.7	0.2	2	12.5	1
12	5	1.73	0.16	3	7.33	1
12	6	2	0.2	3	8.66	1

Procedimiento CORR

5 Variables: lb db nb nhb fc

Estadísticos simples

Variable	N	Media	Desviación típica	Suma	Mínimo	Máximo
lb	72	1.89167	0.43235	136.20000	0.92000	3.50000
db	72	0.17319	0.05775	12.47000	0.10000	0.31000
nb	72	5.05556	3.48796	364.00000	1.00000	14.00000
nhb	72	6.11139	2.60142	440.02000	1.33000	14.00000
fc	72	1.09722	0.29834	79.00000	1.00000	2.00000

Coefficientes de correlación Pearson, N = 72
 Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	lb	db	nb	nhb	fc
lb	1.00000	0.56989 <.0001	-0.05900 0.6225	0.61708 <.0001	0.14832 0.2137
db	0.56989 <.0001	1.00000	-0.02117 0.8599	0.64893 <.0001	-0.25536 0.0304
nb	-0.05900 0.6225	-0.02117 0.8599	1.00000	-0.02394 0.8418	-0.38424 0.0009
nhb	0.61708 <.0001	0.64893 <.0001	-0.02394 0.8418	1.00000	-0.12304 0.3032
fc	0.14832 0.2137	-0.25536 0.0304	-0.38424 0.0009	-0.12304 0.3032	1.00000

Procedimiento CORR

7 Variables: trat rep lb db nb nhb fc

Estadísticos simples

Variable	N	Media	Desviación típica	Suma	Mínimo	Máximo
trat	72	6.50000	3.47628	468.00000	1.00000	12.00000
rep	72	3.50000	1.71981	252.00000	1.00000	6.00000
lb	72	1.89167	0.43235	136.20000	0.92000	3.50000
db	72	0.17319	0.05775	12.47000	0.10000	0.31000
nb	72	5.05556	3.48796	364.00000	1.00000	14.00000
nhb	72	6.11139	2.60142	440.02000	1.33000	14.00000
fc	72	1.09722	0.29834	79.00000	1.00000	2.00000

Coeficientes de correlación Pearson, N = 72
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	trat	rep	lb	db	nb	nhb	fc
trat	1.00000	0.00000 1.00000	0.14628 0.2201	0.24451 0.0385	-0.21373 0.0714	0.35650 0.0021	-0.41421 0.0003
rep	0.00000 1.00000	1.00000	-0.27239 0.0206	-0.17940 0.1316	-0.00939 0.9376	-0.16014 0.1790	-0.06863 0.5668
lb	0.14628 0.2201	-0.27239 0.0206	1.00000	0.56989 <.0001	-0.05900 0.6225	0.61708 <.0001	0.14832 0.2137
db	0.24451 0.0385	-0.17940 0.1316	0.56989 <.0001	1.00000	-0.02117 0.8599	0.64893 <.0001	-0.25536 0.0304
nb	-0.21373 0.0714	-0.00939 0.9376	-0.05900 0.6225	-0.02117 0.8599	1.00000	-0.02394 0.8418	-0.38424 0.0009
nhb	0.35650 0.0021	-0.16014 0.1790	0.61708 <.0001	0.64893 <.0001	-0.02394 0.8418	1.00000	-0.12304 0.3032
fc	-0.41421 0.0003	-0.06863 0.5668	0.14832 0.2137	-0.25536 0.0304	-0.38424 0.0009	-0.12304 0.3032	1.00000

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
trat	12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
rep	6	1 2 3 4 5 6

Número de observaciones 72

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: lb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	2.90016667	0.26365152	1.53	0.1463
Error	60	10.37163333	0.17286056		
Total correcto	71	13.27180000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	lb Media
0.218521	21.97877	0.415765	1.891667

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	2.90016667	0.26365152	1.53	0.1463

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: db

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	0.09538194	0.00867109	3.68	0.0005
Error	60	0.14138333	0.00235639		
Total correcto	71	0.23676528			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	db Media
0.402854	28.02783	0.048543	0.173194

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	0.09538194	0.00867109	3.68	0.0005

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: nb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	657.4444444	59.7676768	17.38	<.0001
Error	60	206.3333333	3.4388889		
Total correcto	71	863.7777778			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	nb Media
0.761127	36.68092	1.854424	5.055556

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	657.4444444	59.7676768	17.38	<.0001

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: nhb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	220.8643611	20.0785783	4.64	<.0001
Error	60	259.6201000	4.3270017		
Total correcto	71	480.4844611			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	nhb Media
0.459670	34.03718	2.080145	6.111389

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	220.8643611	20.0785783	4.64	<.0001

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: fc

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	5.48611111	0.49873737	35.91	<.0001
Error	60	0.83333333	0.01388889		
Total correcto	71	6.31944444			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	fc Media
0.868132	10.74086	0.117851	1.097222

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	5.48611111	0.49873737	35.91	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para lb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.172861
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.8162

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	2.1950	6	4
A	2.1450	6	6
A	2.1150	6	7
A	1.9583	6	12
A	1.9517	6	8
A	1.9117	6	11
A	1.9083	6	9
A	1.8500	6	1
A	1.8333	6	10
A	1.6850	6	5
A	1.6683	6	2
A	1.4783	6	3

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para db

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.002356
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.0953

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.26167	6	4
A			
B A	0.20167	6	11
B A			
B A	0.19500	6	8
B A			
B A	0.19333	6	12
B A			
B A	0.17167	6	9
B A			
B A	0.17000	6	10
B A			
B A	0.17000	6	6
B			
B	0.16500	6	7
B			
B	0.16167	6	3
B			
B	0.14500	6	2
B			
B	0.12667	6	5
B			
B	0.11667	6	1

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para nb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	3.438889
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	3.6403

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	12.500	6	2
B	8.167	6	6
B			
C B	6.667	6	3
C B			
C B D	5.833	6	10
C B D			
C B D	5.500	6	11
C B D			
C E B D	5.167	6	4
C E B D			
C E B D	5.000	6	7
C E B D			
C E F D	4.000	6	8
E F D			
E F D	2.667	6	12
E F D			
E F D	2.333	6	9
E F			
E F	1.833	6	5
F			
F	1.000	6	1

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para nhb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	4.327002
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	4.0835

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	8.915	6	12
A			
A	8.672	6	4
A			
A	8.373	6	11
A			
B A	7.552	6	7
B A			
B A	5.843	6	8
B A			
B A	5.837	6	6
B A			
B A	5.400	6	9
B A			
B A	5.118	6	3
B A			
B A	5.102	6	10
B A			
B A	5.053	6	2
B			
B	4.000	6	1
B			
B	3.472	6	5

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para fc

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.013889
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.2313

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	2.00000	6	1
B	1.16667	6	9
B	1.00000	6	2
B	1.00000	6	4
B	1.00000	6	3
B	1.00000	6	6
B	1.00000	6	7
B	1.00000	6	8
B	1.00000	6	5
B	1.00000	6	10
B	1.00000	6	11
B	1.00000	6	12

1	1	1.9	0.1	1	4	2
1	2	1.7	0.2	1	4	2
1	3	1.8	0.1	1	4	2
1	4	1.7	0.1	1	4	2
1	5	1.9	0.1	1	4	2
1	6	2.1	0.1	1	4	2
2	1	1.71	0.13	13	6.23	1
2	2	1.55	0.14	14	4.92	1
2	3	1.48	0.15	13	4.84	1
2	4	1.71	0.2	13	5.15	1
2	5	1.64	0.11	13	4.07	1
2	6	1.92	0.14	9	5.11	1
3	1	1.82	0.21	8	5.62	1
3	2	1.6	0.17	7	7	1
3	3	1.65	0.21	7	5.28	1
3	4	0.92	0.1	5	3.6	1
3	5	1.55	0.18	6	4.5	1
3	6	1.33	0.1	7	4.71	1
4	1	2.75	0.3	4	9.25	1
4	2	2.38	0.3	5	13	1
4	3	1.73	0.2	8	6.62	1
4	4	2.55	0.31	6	8.83	1
4	5	2.3	0.26	5	10	1
4	6	1.46	0.2	3	4.33	1
5	1	1.4	0.1	1	4	1
5	2	1.96	0.16	3	1.33	1
5	3	1.8	0.2	1	4	1
5	4	1.65	0.1	2	3.5	1
5	5	1.4	0.1	2	3.5	1
5	6	1.9	0.1	2	4.5	1
6	1	1.97	0.13	10	5.6	1
6	2	2.23	0.15	9	5.77	1
6	3	1.96	0.12	5	5	1
6	4	2.47	0.2	8	5.75	1
6	5	2.12	0.17	7	7	1
6	6	2.12	0.25	10	5.9	1
7	1	3	0.3	1	14	1
7	2	1.98	0.12	7	6.85	1
7	3	2.34	0.14	5	6.8	1
7	4	2.57	0.22	4	8	1
7	5	1.74	0.11	10	5	1
7	6	1.06	0.1	3	4.66	1
8	1	2.1	0.27	4	8	1

8	2	1.9	0.16	3	6.66	1
8	3	1.72	0.22	4	4.5	1
8	4	2	0.18	5	6.4	1
8	5	1.87	0.17	4	4.5	1
8	6	2.12	0.17	4	5	1
9	1	3.5	0.2	1	12	2
9	2	2.24	0.2	5	4.4	1
9	3	1.75	0.2	2	4	1
9	4	1.5	0.2	1	4	1
9	5	1	0.1	2	4	1
9	6	1.46	0.13	3	4	1
10	1	1.35	0.15	2	3.5	1
10	2	2.61	0.23	6	6.33	1
10	3	1.85	0.17	12	6.08	1
10	4	1.5	0.2	2	3.5	1
10	5	1.58	0.12	5	3.2	1
10	6	2.11	0.15	8	8	1
11	1	1.54	0.12	7	5	1
11	2	2.2	0.2	4	10	1
11	3	1.75	0.12	7	6.28	1
11	4	2.13	0.26	6	8.16	1
11	5	1.9	0.26	5	10.8	1
11	6	1.95	0.25	4	10	1
12	1	2.2	0.2	2	5.5	1
12	2	1.9	0.2	2	11	1
12	3	2.22	0.2	4	8.5	1
12	4	1.7	0.2	2	12.5	1
12	5	1.73	0.16	3	7.33	1
12	6	2	0.2	3	8.66	1

Procedimiento CORR

5 Variables: lb db nb nhb fc

Estadísticos simples

Variable	N	Media	Desviación típica	Suma	Mínimo	Máximo
lb	72	1.89167	0.43235	136.20000	0.92000	3.50000
db	72	0.17319	0.05775	12.47000	0.10000	0.31000
nb	72	5.05556	3.48796	364.00000	1.00000	14.00000
nhb	72	6.11139	2.60142	440.02000	1.33000	14.00000
fc	72	1.09722	0.29834	79.00000	1.00000	2.00000

Coefficientes de correlación Pearson, N = 72
 Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	lb	db	nb	nhb	fc
lb	1.00000	0.56989 <.0001	-0.05900 0.6225	0.61708 <.0001	0.14832 0.2137
db	0.56989 <.0001	1.00000	-0.02117 0.8599	0.64893 <.0001	-0.25536 0.0304
nb	-0.05900 0.6225	-0.02117 0.8599	1.00000	-0.02394 0.8418	-0.38424 0.0009
nhb	0.61708 <.0001	0.64893 <.0001	-0.02394 0.8418	1.00000	-0.12304 0.3032
fc	0.14832 0.2137	-0.25536 0.0304	-0.38424 0.0009	-0.12304 0.3032	1.00000

Procedimiento CORR

7 Variables: trat rep lb db nb nhb fc

Estadísticos simples

Variable	N	Media	Desviación típica	Suma	Mínimo	Máximo
trat	72	6.50000	3.47628	468.00000	1.00000	12.00000
rep	72	3.50000	1.71981	252.00000	1.00000	6.00000
lb	72	1.89167	0.43235	136.20000	0.92000	3.50000
db	72	0.17319	0.05775	12.47000	0.10000	0.31000
nb	72	5.05556	3.48796	364.00000	1.00000	14.00000
nhb	72	6.11139	2.60142	440.02000	1.33000	14.00000
fc	72	1.09722	0.29834	79.00000	1.00000	2.00000

Coeficientes de correlación Pearson, N = 72
Prob > |r| suponiendo H0: Rho=0

	trat	rep	lb	db	nb	nhb	fc
trat	1.00000	0.00000 1.00000	0.14628 0.2201	0.24451 0.0385	-0.21373 0.0714	0.35650 0.0021	-0.41421 0.0003
rep	0.00000 1.00000	1.00000	-0.27239 0.0206	-0.17940 0.1316	-0.00939 0.9376	-0.16014 0.1790	-0.06863 0.5668
lb	0.14628 0.2201	-0.27239 0.0206	1.00000	0.56989 <.0001	-0.05900 0.6225	0.61708 <.0001	0.14832 0.2137
db	0.24451 0.0385	-0.17940 0.1316	0.56989 <.0001	1.00000	-0.02117 0.8599	0.64893 <.0001	-0.25536 0.0304
nb	-0.21373 0.0714	-0.00939 0.9376	-0.05900 0.6225	-0.02117 0.8599	1.00000	-0.02394 0.8418	-0.38424 0.0009
nhb	0.35650 0.0021	-0.16014 0.1790	0.61708 <.0001	0.64893 <.0001	-0.02394 0.8418	1.00000	-0.12304 0.3032
fc	-0.41421 0.0003	-0.06863 0.5668	0.14832 0.2137	-0.25536 0.0304	-0.38424 0.0009	-0.12304 0.3032	1.00000

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
trat	12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
rep	6	1 2 3 4 5 6

Número de observaciones 72

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: lb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	2.90016667	0.26365152	1.53	0.1463
Error	60	10.37163333	0.17286056		
Total correcto	71	13.27180000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	lb Media
0.218521	21.97877	0.415765	1.891667

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	2.90016667	0.26365152	1.53	0.1463

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: db

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	0.09538194	0.00867109	3.68	0.0005
Error	60	0.14138333	0.00235639		
Total correcto	71	0.23676528			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	db Media
0.402854	28.02783	0.048543	0.173194

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	0.09538194	0.00867109	3.68	0.0005

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: nb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	657.4444444	59.7676768	17.38	<.0001
Error	60	206.3333333	3.4388889		
Total correcto	71	863.7777778			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	nb Media
0.761127	36.68092	1.854424	5.055556

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	657.4444444	59.7676768	17.38	<.0001

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: nhb

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	220.8643611	20.0785783	4.64	<.0001
Error	60	259.6201000	4.3270017		
Total correcto	71	480.4844611			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	nhb Media
0.459670	34.03718	2.080145	6.111389

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	220.8643611	20.0785783	4.64	<.0001

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: fc

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	5.48611111	0.49873737	35.91	<.0001
Error	60	0.83333333	0.01388889		
Total correcto	71	6.31944444			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	fc Media
0.868132	10.74086	0.117851	1.097222

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	11	5.48611111	0.49873737	35.91	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para lb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.172861
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.8162

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	2.1950	6	4
A			
A	2.1450	6	6
A			
A	2.1150	6	7
A			
A	1.9583	6	12
A			
A	1.9517	6	8
A			
A	1.9117	6	11
A			
A	1.9083	6	9
A			
A	1.8500	6	1
A			
A	1.8333	6	10
A			
A	1.6850	6	5
A			
A	1.6683	6	2
A			
A	1.4783	6	3

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para db

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.002356
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.0953

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	0.26167	6	4
A			
B A	0.20167	6	11
B A			
B A	0.19500	6	8
B A			
B A	0.19333	6	12
B A			
B A	0.17167	6	9
B A			
B A	0.17000	6	10
B A			
B A	0.17000	6	6
B			
B	0.16500	6	7
B			
B	0.16167	6	3
B			
B	0.14500	6	2
B			
B	0.12667	6	5
B			
B	0.11667	6	1

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para nb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	3.438889
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	3.6403

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	12.500	6	2
B	8.167	6	6
B			
C B	6.667	6	3
C B			
C B D	5.833	6	10
C B D			
C B D	5.500	6	11
C B D			
C E B D	5.167	6	4
C E B D			
C E B D	5.000	6	7
C E B D			
C E F D	4.000	6	8
E F D			
E F D	2.667	6	12
E F D			
E F D	2.333	6	9
E F			
E F	1.833	6	5
F			
F	1.000	6	1

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para nhb

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	4.327002
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	4.0835

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	8.915	6	12
A			
A	8.672	6	4
A			
A	8.373	6	11
A			
B A	7.552	6	7
B A			
B A	5.843	6	8
B A			
B A	5.837	6	6
B A			
B A	5.400	6	9
B A			
B A	5.118	6	3
B A			
B A	5.102	6	10
B A			
B A	5.053	6	2
B			
B	4.000	6	1
B			
B	3.472	6	5

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para fc

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.013889
Valor crítico del rango estudentizado	4.80850
Diferencia significativa mínima	0.2313

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	2.00000	6	1
B	1.16667	6	9
B	1.00000	6	2
B	1.00000	6	4
B	1.00000	6	3
B	1.00000	6	6
B	1.00000	6	7
B	1.00000	6	8
B	1.00000	6	5
B	1.00000	6	10
B	1.00000	6	11
B	1.00000	6	12

