

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
HÍBRIDOS DE *Eustoma grandiflorum* x *Eustoma exaltatum* EN
CONDICIONES *in vitro* Y *ex vitro*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

YULEMNE ZÁRATE DÍAZ

DIRECTORA: Dra. Guadalupe López Puc

CODIRECTOR: Dr. Rodrigo Barba González

ASESOR: Dr. Ernesto Tapia Campos

MÉRIDA, YUCATÁN. MÉXICO, Febrero de 2020



Guadalajara, Jalisco, México, Febrero de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto provienen en las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaran de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Yulemne Zárate Díaz




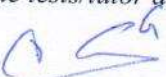
Guadalajara, Jalisco a 28 de enero de 2020

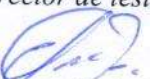
CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante Yulemne Zarate Díaz, una vez leída y revisada la Tesis titulada “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE *EUSTOMA GRANDIFLORUM* X *EUSTOMA EXALTATUM* EN CONDICIONES *IN VITRO* Y *EX VITRO* ” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias de la Floricultura con la opción terminal en Mejoramiento genético, durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al 28 de enero del dos mil veinte.


Dra. Guadalupe López Puc
Director de tesis/tutor académico


Dr. Rodrigo Barba González
Co-director de tesis/tutor en planta


Dr. Ernesto Tapia Campos
Asesor/Asesora



Guadalajara, Jalisco, a 18 de febrero de 2020

CP/304/2020

YULEMNE ZÁRATE DÍAZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA FLORICULTURA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1701PF6381
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Caracterización morfológica y molecular de híbridos de *Eustoma grandiflorum* x *Eustoma exaltatum* en condiciones in vitro y ex vitro**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Guadalupe López Puc Directora de tesis
Dr. Rodrigo Barba González. Co-director de tesis
Dr. Ernesto Tapia Campos. Asesor

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE

Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



LIBERACIÓN DEL SÍNODO



Mérida, Yucatán a 28 de Febrero de 2020

Dr. Rodrigo Barba González
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco.

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante YULEMNE ZÁRATE DÍAZ, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE *Eustoma grandiflorum* x *Eustoma exaltatum* EN CONDICIONES *in vitro* Y *ex vitro***” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al 1 del mes de octubre del 2018.

Dr. Erick Alberto Cauch Aguilera

Presidente

Dr. Alberto Uc Varguez

Secretario

Dra. Guadalupe López Puc

Vocal

JUNTA DIRECTIVA

Título

Caracterización morfológica y molecular de híbridos de *Eustoma grandiflorum* x *Eustoma exaltatum* en condiciones *in vitro* y *ex vitro*

Presenta: Yulemne Zárate Díaz

Junta directiva:

Directora: Dra. Guadalupe López Puc

Co-director: Dr. Rodrigo Barba González

Asesor: Dr. Ernesto Tapia Campos

AGRADECIMIENTOS

A la totalidad por haberme permitido coincidir con personas que han sido soporte y compañía durante este transcurso.

A mi madre, por ser pilar en mi vida, dándome su amor incondicional y a un hermano a quien le debo tantos instantes de alegría y tanto amor.

A Hiram, Jorge, Dani, Betsy, Eli, Manu, por mencionar solo algunos, gracias infinitas por ser parte de esta experiencia y brindarme su amistad.

A Pablo Gordillo, por estar en las buenas y en las malas, por su apoyo en los momentos difíciles y simplemente por ser parte de mi vida.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo en la Subsede Sureste.

A la Dra. Guadalupe López Puc, Dr. Erick Aguilera, Dr. Zahaed, Dr. Alberto, Dr. Gil y a mi comité tutorial, por su constante orientación, enseñanza y comprensión durante el desarrollo de la investigación.

Por último, pero no menos importante, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de maestría otorgada.

DEDICATORIAS

A mi madre Marleni, por ser mi guía y por su apoyo incondicional.

A mi hermano Luis por adornar mi vida con su presencia

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	Abreviaturas y símbolos	8
1.	RESUMEN	9
2.	INTRODUCCIÓN	11
3.	ANTECEDENTES	13
3.1	Panorama general de la producción florícola	13
3.1.1	Estadísticas de producción a nivel Internacional	13
3.1.2	Estado actual de la florícola en México	14
3.2	Generalidades del género <i>Eustoma</i>	15
3.2.1	Clasificación taxonómica	15
3.2.2	Distribución geográfica de <i>E. exaltatum</i> y <i>E. grandiflorum</i>	16
3.2.3	Importancia comercial del género <i>Eustoma</i>	17
3.3	Mejoramiento genético en plantas	17
3.4	Hibridación en plantas ornamentales	18
3.5	Marcadores genéticos	19
5.2.1	Marcas morfológicas	21
3.5.2	Marcadores moleculares	21
3.6	Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Eustoma</i>	23
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5.	JUSTIFICACIÓN	25
6.	HIPÓTESIS	26
7.	OBJETIVOS	27
General	28
Específicos	28
8.	Metodología	28
8.2	obtención del material vegetativo	31
8.3	Establecimiento en cultivo <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	32
8.3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de semillas híbridas de <i>Eustoma</i>	32
8.3.2	Morfogénesis de hojas de plántulas híbridas de <i>Eustoma</i> desarrolladas <i>in vitro</i>	32

8.3.3 Cultivo <i>ex vitro</i> en condiciones casa sombra	34
8.4 Caracterización morfológica	36
8.5 Caracterización molecular de híbridos	38
8.4.1 Extracción de ADN genómico	39
8.4.2 Amplificación de PCR	39
9. Resultados y Discusión	40
9.1 Establecimiento en cultivo <i>in vitro</i>	40
9.2 Caracterización morfológica	44
9.2.1 Valoración de caracteres morfológicos en híbridos del género <i>Eustoma</i>	44
9.2.2 Selección de individuos sobresalientes en híbridos del género <i>Eustoma</i>	52
9.2.3 Medición colorimétrica de flores en híbridos del genero <i>Eustoma</i>	58
9.3 Caracterización molecular	62
10. Conclusiones.....	65
11. Referencias	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países: participación porcentual en la exportación de flor de corte a nivel mundial en el año 2017.....	13
Tabla 2. Principales países: participación porcentual en la importación de flor de corte a nivel mundial en el año 2017.....	13
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>E. grandiflorum</i> y <i>E. exaltatum</i>	16
Tabla 4. Patentes según la European patent Office (EPO) obtenidas a partir de selección por marcadores.....	20
Tabla 5. Explante, medio utilizado y tipo de regeneración reportado en cultivo <i>in vitro</i> en el género <i>Eustoma</i>	23
Tabla 6. Líneas híbridas del género <i>Eustoma</i> obtenidas a partir de la autopolinización (S1) de individuos de retrocruzamiento 1 (BC1).	31
Tabla 7. Condiciones de Temperatura en el establecimiento <i>ex vitro</i> de híbridos del género <i>Eustoma</i>	35
Tabla 8. Características morfológicas establecidas por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV) para el género <i>Eustoma</i>	36
Tabla 9. Marcadores moleculares SSR reportados para la familia de las Gentianaceae..	38
Tabla 10. Respuesta genotípica en la germinación <i>in vitro</i> de híbridos de <i>E. exaltatum</i> x <i>E. grandiflorum</i>	40
Tabla 11. Respuesta genotípica de híbridos del género <i>Eustoma</i> en la regeneración de brotes adventicios en cultivo <i>in vitro</i>	42
Tabla 12. Descripción y estadísticos básicos para caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados en híbridos de <i>E. grandiflorum</i> x <i>E. exaltatum</i>	46
Tabla 13. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género <i>Eustoma</i>	47
Tabla 14. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género <i>Eustoma</i>	48
Tabla 15. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género <i>Eustoma</i>	48
Tabla 16. Valores propios y porcentaje de la variabilidad para los primeros 4 componentes principales en el análisis de híbridos del género <i>Eustoma</i>	49
Tabla 17. Vectores propios de caracteres cuantitativos y cualitativos que integran los primeros 4 componentes principales en el análisis de híbridos del género <i>Eustoma</i>	50
Tabla 18. Medición colorimétrica de flores en híbridos del género <i>Eustoma</i>	59
Tabla 19. Primers polimórficos amplificados en híbridos del género <i>Eustoma</i>	63
Tabla 20. Parámetros genéticos de híbridos sobresalientes del género <i>Eustoma</i>	63
Tabla 21. Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro / entre Híbridos sobresalientes del género <i>Eustoma</i> basados en datos de SSR.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1. Especies del género <i>Eustoma</i>. A) <i>Eustoma exaltatum</i>. B) <i>Eustoma exaltatum</i>.....</u>	15
<u>Figura 2. Turner (2014) Taxonomic overview of <i>Eustoma</i> (Gentianaceae). [Imagen] Recuperado de http://www.phytologia.com</u>	16
<u>Figura 3. Turner (2014) Taxonomic overview of <i>Eustoma</i> (Gentianaceae). [Imagen] Recuperado de http://www.phytologia.com</u>	17
<u>Figura 4. Esquema general de proyecto: Caracterización morfológica y molecular de híbridos de <i>Eustoma grandiflorum</i> x <i>Eustoma exaltatum</i> en condiciones <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>.</u>	30
<u>Figura 5. Propagación <i>in vitro</i> de híbridos del género <i>Eustoma</i>. A) Semillas de híbridos. B) Germinación después de 21 días. C) Plántulas a las cinco semanas de desarrollo. D) Plántulas como fuente de explante para organogénesis. E) Brotes obtenidos después de 60 días de cultivo F) Brotes en etapa de enraizamiento después de 60 días de cultivo.</u>	33
<u>Figura 6. Proceso de cultivo en condiciones de casa sombra de híbridos del género <i>Eustoma</i>. A) Planta de 5 cm para cultivo <i>ex vitro</i>. B) Riego de plántulas. C) Plántulas en cuarto de cultivo protegidas por una bolsa de nylon. D) Plántulas en casa sombra después de 15 días. E) Plantas en etapa de floración.</u>	35
<u>Figura 9. Caracterización morfológica de híbridos del género <i>Eustoma</i>. A) Evaluación longitudinal de la parte foliar. B) Evaluación del diámetro floral. C) Evaluación de la anchura de pétalos. D) Evaluación de las características del tallo a partir del cuarto entrenudo.</u>	37
<u>Figura 10. Organogénesis adventicia de híbridos del género <i>Eustoma</i>. A) Brotes formados en los bordes del explante foliar del híbrido 1512095 con una media en número de brotes de 16.91 a los 60 días de cultivo; B) Explante del híbrido 1512096 con una media en número de brotes de 18.00 a los 60 días de cultivo; C) y D) Explantes del híbrido 1512072 con una media en longitud de brotes de 1.25 cm a los 60 días de cultivo.</u>	41
<u>Figura 11. Gráfico de saturación del análisis de componentes principales entre caracteres morfológicos e híbridos del género <i>Eustoma</i>. ¡Error! Marcador no definido.</u>	
<u>Figura 12. Dendograma de híbridos del género <i>Eustoma</i> basado en los primeros cuatro componentes, mediante la distancia taxonómica promedio usando el método de agrupamiento UPGMA.</u>	52
<u>Figura 13. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a Altura de planta (Corto: 11-29.03 cm, Medio: 29.03-47.07cm, Alto: 47.06-65.06cm). B) De acuerdo a número de yemas florales: Poco: 0-3.33 flores; Medio: 3.33 – 6.66 flores; Muchos 6.66-10 flores.</u>	54

Figura 14. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a Longitud de flores (Corto: 2.86 - 4.00 cm, Medio: 4.00 - 5.14 cm, Largo: 5.14 - 6.3cm. B) De acuerdo a Diámetro de flores (Pequeño: 3.2 - 4.6 cm; Medio: 4.6 -6.0 cm; Largo: 6 - 7.4 cm). 56
Figura 15. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a color de flor. B) De acuerdo a longitud de pedicelo (Corto: 1.29 – 3.22 cm, Medo: 3.29 – 4.51 cm, Largo: 4.51- 7.1 cm). 57

I. Abreviaturas y símbolos

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AFLP: Amplified fragment length polymorphism.

AIA: Acido Indol Acético.

BA: Benciladenina.

BAP: 6-Bencilaminopurina.

BC1: Descendientes de retrocruzamiento 1.

CA: Carbón activado.

dNTP's: desoxirribonucleótidos trifosfatos.

F1: Generación filial 1.

AG₃: Acido giberélico.

HR: Humedad relativa.

MS: Murashige y Skoog, 1962.

mM: Milimolar.

μM: Micromolar.

M: Molar

ANA: Ácido naftalenacético.

pb: Pares de base.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

p/v: peso/volumen.

RAPD: Random amplified polymorphic DNA.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SSR: Simple Sequence repeats.

S1: Descendencia de autopolinización 1.

TDZ: Tiazuron.

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

1. RESUMEN

Eustoma grandiflorum es una especie de importancia ornamental, perteneciente al género *Eustoma*, su demanda en el mercado radica en la amplia gama de colores que presenta, larga vida en florero, así como una alta rentabilidad. Desafortunadamente, este cultivo presente arrosetamiento y aborto floral a temperaturas mayores a 27°C, que limitan la distribución del cultivo; esta situación ha generado el desarrollo de programas de mejoramiento genético con la intención de producir variedades resistentes a zonas con altas temperaturas. El presente estudio se realizó para analizar la variabilidad genética de híbridos obtenidos a partir de cruas interespecíficas entre *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* (Barba *et al.*, 2017). Se analizaron características morfológicas basándonos en descriptores ya reportados para *E. grandiflorum* y la caracterización molecular se hizo utilizando secuencias simples repetidas (SSR). También se evaluó el comportamiento en la capacidad organogénica en cultivo *in vitro* de los híbridos. Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica mostraron los valores más altos en características de importancia ornamental en los híbridos 1512063, 1512096, 1512098, 1512100. En el análisis de componentes principales, se obtuvo una variación de 73.70% dentro de cuatro componentes principales. Los perfiles genéticos obtenidos con los marcadores moleculares utilizados mostraron baja diversidad genética entre los híbridos seleccionados de acuerdo al comportamiento observado en la caracterización morfológica, obteniendo así valores en el porcentaje total de loci polimórficos (PLP) entre los híbridos de 86.67%, índice de Shannon (I)= 0.539 y un coeficiente de diferenciación genética (Fst) de 0.064. El análisis de varianza molecular (AMOVA) reflejó una mayor variación genética (66.91%) relacionada a las diferencias entre híbridos que dentro de híbridos (33.09%). En el cultivo *in vitro*, los híbridos presentaron un comportamiento estadísticamente significativo durante el proceso de organogénesis adventicia, obteniendo un mayor número de brotes en los híbridos 1512095 y 1512096 (16.91 ± 4.25 y 18 ± 4.76 , respectivamente) y mayor longitud de raíces en los híbridos 1512072 y 1512100 (4.81 ± 1.55 cm y 4.32 ± 0.92 respectivamente). Con base a los resultados obtenidos se concluye que es posible

propagar híbridos del género *Eustoma* con fines comerciales en las condiciones de clima de la Península de Yucatán, lo cual permitirá incrementar los alcances de la Floricultura en México.

PALABRAS CLAVE

Eustoma, híbridos, caracteres morfológicos, varianza genética, selección de individuos sobresalientes, SSR.

2. INTRODUCCIÓN

La floricultura en México es una actividad de gran importancia en el país. En el año 2017, esta actividad generó 188 mil empleos directos, 50 mil eventuales y más de un millón de trabajos indirectos anuales (SAGARPA, 2018). Del total de la producción ornamental en el país, solo el 12% es exportado a países vecinos, otorgando a México una participación mundial de 0.22% (UN COMTRADE, 2017), lo que declara a México como un país con poca participación en el mercado global florícola. Esto representa un deterioro tanto macro como microeconómico en el país. Con vista en lo anterior, se han buscado diversas estrategias para lograr ampliar el mercado ornamental, buscando aumentar el volumen y calidad de la producción, así como la obtención de nuevas variedades ornamentales que puedan competir con las existentes, de las cuales la mayoría provienen de las grandes potencias mundiales de la floricultura. Dentro de las especies con valor comercial, se encuentra *Eustoma grandiflorum*, conocida comúnmente como Lisianthus, perteneciente al género *Eustoma*. Actualmente es cultivada como flor en maceta y flor de corte, su cultivo en México, es realizado en el Edo. de México, Jalisco, Morelos, Puebla y en la Cd. de México.

Lisianthus es una especie relativamente nueva en el mercado que ha ido aumentando en su demanda debido a las características ornamentales que presenta, entre ellas, una larga vida en florero, amplia gama de colores (de púrpura a lavanda y de rosa a blanco), así como alta rentabilidad. Esta flor es vendida por decenas, llegando a costar hasta \$70.⁰⁰ MN por decena. Por otra parte, dentro del mismo género se encuentra *E. exaltatum*, la cual no es comercializada comúnmente debido a que cuenta con una flor pequeña, sin embargo, esta tiene la particularidad de distribuirse en climas cálidos a diferencia de *E. grandiflorum*. Las diferencias en las condiciones geográficas y climáticas, así como morfológicas de estas dos especies del género *Eustoma*, ha hecho que se plantee realizar mejoramiento genético para obtener híbridos que cuenten con las características más favorables de ambas especies.

El uso de marcadores morfológicos en conjunto con marcadores moleculares basados en la amplificación con PCR de secuencias simples repetidas (SSR) nos permite tener un conocimiento más amplio de la estructura y de variación genética existente dentro y entre poblaciones, logrando así una selección adecuada de individuos con características sobresalientes que en un futuro puedan ser introducidos al mercado. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este proyecto es caracterizar morfológica y molecularmente a híbridos de *E. exaltatum* x *E. grandiflorum* en condiciones de cultivo *ex vitro*, así como la capacidad organogénica en cultivo *in vitro*.

3. ANTECEDENTES

3.1 Panorama general de la producción florícola

3.1.1 Estadísticas de producción a nivel Internacional

La floricultura es trabajada por un gran número de países, según datos de United Nations International Trade Statistics Database en el 2017, entre los principales exportadores de flores de corte destacaba en primer lugar los países bajos con casi la mitad del total de producto exportado, en segundo lugar, Colombia y el resto conformado por Ecuador, Kenia y Etiopia (Tabla 1).

Tabla 1. Principales países: participación porcentual en la exportación de flor de corte a nivel mundial en el año 2017.

País exportador	Participación porcentual (%)
Países bajos	43.0
Colombia	16.0
Ecuador	10.0
Kenia	8.1
Etiopia	2.4
México	0.22

Fuente: United Nations International Trade Statistics Database (UN COMTRADE DATABASE).

En contraparte, en los principales importadores a nivel mundial se encuentran Estados Unidos, Alemania, Reino Unido, Países Bajos y Rusia (Tabla 2).

Tabla 2. Principales países: participación porcentual en la importación de flor de corte a nivel mundial en el año 2017.

País importador	Participación porcentual (%)
Estados unidos	20.0
Alemania	14.0
Reino Unido	11.0
Países Bajos	11.0
Rusia	5.2

Fuente: United Nations International Trade Statistics Database (UN COMTRADE DATABASE).

El impacto de México en el mercado Internacional es mínimo, debido a las bajas cantidades de producción florícola, lo que ha hecho que México se posicione

alrededor del lugar 30 de los países productores, con un 0.22% de exportación a nivel mundial (UN COMTRADE, 2017).

La exportación de la floricultura mexicana está principalmente concentrada en los Estados Unidos, lo que manifiesta una baja diversificación; Además, en los últimos años el coeficiente de apertura económica de las importaciones de la floricultura en México es mayor que el de las exportaciones (Ramirez y Avitia, 2017).

3.1.2 Estado actual de la florícola en México.

La producción de ornamentales en México ha aumentado en los últimos años. En el año 2017 se reportó que para esta actividad se destinó una superficie de 22,700 ha (SIAP, 2017), del cual sólo el 12% era exportado. Por otra parte, México no importa productos terminados como flores, más bien, importar semillas y partes vegetativas de todo tipo que sirven tanto para cultivar como para ornato (Ramirez y Avitia, 2017).

A nivel nacional, el principal estado productor es el Estado de México que concentra el 90% de la producción y es el único estado de la república con capacidad de exportación, siendo Estados Unidos y Canadá sus principales mercados, este estado junto con otros como Puebla, Michoacán, Jalisco y la ciudad de México generan aproximadamente una actividad de 188 mil empleos directos, 50 mil eventuales y más de un millón de trabajos indirectos anuales (SAGARPA, 2018).

Los cultivos que destacan en los principales estados productores son el crisantemo, gladiola, clavel, rosa (SAGARPA, 2018). También se pueden encontrar otras especies ornamentales de alto valor comercial, como, por ejemplo: *Eustoma grandiflorum* perteneciente al género *Eustoma*.

3.2 Generalidades del género *Eustoma*

3.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Eustoma* abarca especies herbáceas, perteneciente a la familia de las Gentianaceas, cuyos individuos forman una roseta de hojas pecioladas, cordiformes y opuestas, (Carrillo, 2006) con tallos de 80 cm de alto aproximadamente, flores vistosas de color purpura a lavanda y rosa a blanco, estas pueden ser solitarias o en panículas (Turner, 2014).

El género *Eustoma* es descrito como si tuviera dos especies simpátricas: *E. exaltatum* de flor pequeña, cuya corola es de 2.5 cm (Fig.1A); y *E. russellianum*, conocida también como *E. grandiflorum*, con distribución restringida y de grandes flores que van de 5 a 6 cm (Fig. 1B), estas dos especies son interfértiles y generan progenie fértil (Turner, 2014). La clasificación taxonómica de ambas especies se describe en la Tabla 1.



Figura 1. Flores de las especies del género *Eustoma*: (A) Flor de la especie *Eustoma exaltatum*. (B) Flor de la especie *Eustoma exaltatum*.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *E. grandiflorum* y *E. exaltatum*.

Rango	Nombre científico
<i>Reino</i>	Plantae
<i>Subreino</i>	Traecheobionta
<i>Superdivisión</i>	Spermatophyta
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase</i>	Asteridae
<i>Orden</i>	Gentianales
<i>Familia</i>	Gentianaceae
<i>Género</i>	Eustoma
<i>Especie</i>	<i>Eustoma grandiflorum</i> y <i>Eustoma exaltatum</i>

3.2.2 Distribución geográfica de *E. exaltatum* y *E. grandiflorum*

Eustoma es considerado un género cosmopolita (Takhtajan, 2009). sin embargo, *E. exaltatum* es nativa del sur de los Estados unidos, México, América Central y las Indias Occidentales, particularmente, esta se extiende en gran parte del país (Fig. 2).

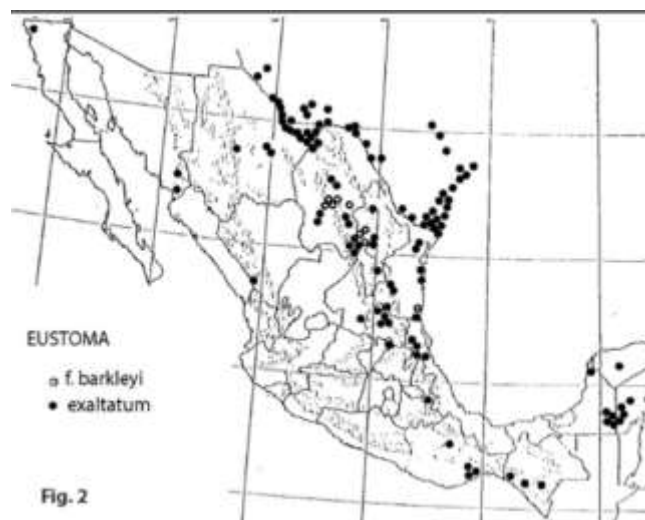


Figura 2. Turner (2014) Taxonomic overview of *Eustoma* (Gentianaceae). [Imagen] Recuperado de <http://www.phytologia.com>

Por otro lado, *E. grandiflorum* es del sur de los Estados Unidos (Turner, 2014)

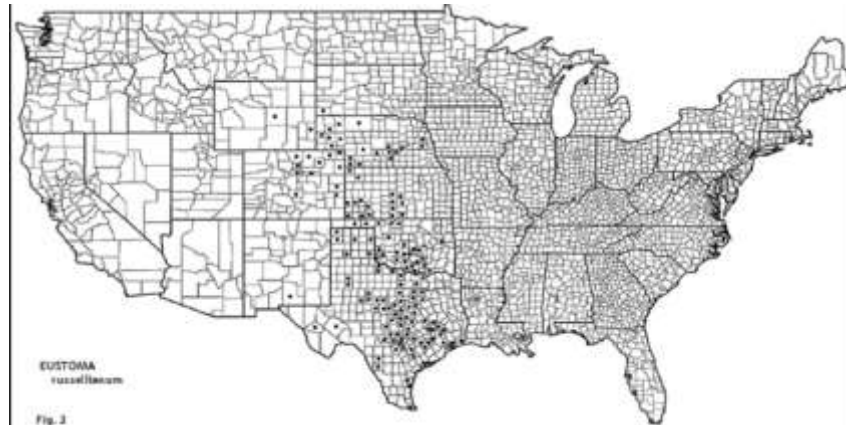


Figura 3. Turner (2014) Taxonomic overview of *Eustoma* (Gentianaceae). [Imagen] Recuperado de <http://www.phytologia.com>

3.2.3 Importancia comercial del género *Eustoma*

El género *Eustoma* es de importancia comercial, en los últimos años ha sido explotada tanto como para flor de corte, así como para plantas en macetas. Su valor radica en las características ornamentales que presenta tales como la diversidad de colores en sus flores, larga vida en florero (Castillo *et al.*, 2017) y número de botones florales. Por lo tanto, se ha logrado posicionar en una de las ornamentales elegidas para consumidores y para productores, lo que ha aumentado su demanda en los últimos años (Cruz *et al.*, 2006). Debido al potencial económico, diversos programas de mejoramiento genético se han venido realizando en los últimos años para éste género (Barba *et al.*, 2015; Barba *et al.*, 2017).

3.3 Mejoramiento genético en plantas

El mejoramiento genético en plantas tiene como objetivo principal la mejora de especies para beneficio humano, satisfaciendo las necesidades tanto de los productores como de los consumidores (Jain *et al.*, 2010); permite la manipulación

de los atributos, la estructura y la composición de las plantas, para mejorarlas y obtener cambios permanentes y hereditarios (Acquaah, 2009).

Esta disciplina comenzó con la discriminación entre diferentes tipos de plantas para seleccionar y retener las plantas con las características más deseables (Acquaah, 2009). Actualmente es utilizada en diversas áreas, en particular en floricultura, para mejorar el rendimiento y la calidad de características florales como el color, tamaño, forma y vida útil (De., 2017).

Una de las técnicas más empleadas para el mejoramiento de especies ornamentales es la hibridación, mediante la cual, se logran obtener variedades híbridas con nuevas características.

3.4 Hibridación en plantas ornamentales

La hibridación consiste en la cruce de dos plantas genóticamente diferentes entre sí para producir un nuevo individuo (De, 2017); es la técnica principal para crear variabilidad en las especies con flores (Acquaah, 2009).

En las plantas con flores, el principal objetivo de la reproducción selectiva es aumentar la variabilidad genética en rasgos ornamentales como el color de la flor, la forma de la flor y la forma de la planta. Para lograr este objetivo, las hibridaciones se han utilizado ampliamente en varios programas de mejoramiento (Cheng *et al.*, 2010; Suarez *et al.*, 2013; Pakoca, 2014; Venturieri *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

En flores hermafroditas, la hibridación se realiza mediante la técnica de emasculación manual y polinización cruzada manual, la cual es definida como transferencia de polen de una planta a los estigmas de la flor de otra planta (De., 2017).

En el caso del género *Eustoma*, su alta demanda debido a sus propiedades ornamentales y su problemática de adaptación a temperaturas mayores de 25°C, la ha llevado a ser parte de diversos trabajos de mejoramiento genético, tales como Barba *et al.*, (2015) quienes llevaron a cabo hibridación interespecífica de *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* en ambas direcciones (ambos sirvieron como parental femenino y masculino), obteniendo cientos de híbridos, de los cuales, ciertos individuos presentaron diferentes rasgos a los parentales como el tamaño de flor y color, así como cierta tolerancia al calor. En específico los híbridos que provenían de *E. exaltatum* White en cualquiera de las dos direcciones, poseían una amplia variación en el color de la flor. Los autores realizaron estudios citogenéticos reportando así un número cromosómico para *E. exaltatum* de $2n=72$.

En otro reporte, Barba *et al.* (2017) realizaron hibridación interespecífica de *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* en ambas direcciones, logrando obtener generaciones F1 (Filial 1), BC1 (retrocruza 1) y S1 (autofecundación), los cuales presentaron importantes rasgos ornamentales como flores dobles y de gran tamaño. Uno de los aspectos más importantes a considerar es la presencia de co-dominancia de la progenie al cruzar *E. grandiflorum* White con híbridos F1 rosa.

Para la obtención de genotipos con potencial ornamental es necesario llevar a cabo la selección de individuos sobresalientes, estos deben ser estudiados dentro de una población para conocer la variación genética entre ellos. Para ello, es necesario llevar a cabo una selección asistida mediante el uso de marcadores genéticos que permiten conocer la diversidad genética.

3.5 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son caracteres que presentan polimorfismo o variabilidad detectable en individuos de una población segregante (Levitus, *et al.*, 2010); representan diferencias genéticas entre organismos o especies individuales que ocupan posiciones genómicas específicas dentro de los cromosomas, estos no

representan a los genes diana, más bien, se encuentran muy ligados a estos y se denominan como "etiquetas" genéticas, lo que significa que no afectan el fenotipo del rasgo de interés, ya que se localizan cerca o "vinculados" a los genes que controlan el rasgo (Collard *et al.*, 2005).

El uso de los marcadores genéticos hace más eficiente el proceso de caracterización y/o selección. Para que este cumpla con su objetivo es necesario considerar que debe ser polimórfico (dentro y entre especies), de herencia mendeliana no epistática, insensible a los efectos ambientales, capaz de diferenciar individuos heterocigotos de homocigotos, de rápida identificación y simple análisis, y de detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Levitus *et al.*, 2010). En la Tabla 4, se presentan las patentes registradas en la EPO (European patent Office), que se obtuvieron mediante selección por marcadores en algunos cultivos hortícolas.

Los marcadores pueden agruparse en bioquímicos, morfológicos y moleculares; Actualmente los principales marcadores genéticos que se utilizan en programas de mejoramiento y conservación hacen referencia a marcadores morfológicos, que son utilizados por su facilidad para identificar diferencias y similitudes, y marcadores de ADN nuclear o conocidos también como moleculares, utilizados en mayor medida por su exactitud.

Tabla 4. Patentes según la European patent Office (EPO) obtenidas a partir de selección por marcadores.

Número EP	Especies	Empresa
EP 1931193	Pepino	Enza Zaden
EP 1804571	Pimiento	Ruiter Seeds/ Monsanto
EP 1853710	Pimiento	Syngenta
EP 1263961	Trigo	Limagrain
EP 2173887	Maíz	Biogemma

EP: European patent

5.2.1 Marcares morfológicos

Los marcadores morfológicos están basados en diferencias y similitudes en el fenotipo. Mediante el empleo de estos marcadores, se lleva a cabo la caracterización morfológica la cual nos permite estimar y evaluar la distancia genética entre diferentes variedades, identificando grupos heteróticos mediante métodos de agrupamiento (Barros *et al.*, 2019).

Su fácil manejo ha hecho que sean aplicados en programas de mejoramiento para estudiar la diversidad genética (Barros *et al.*, 2019; Mangosongo *et al.*, 2019; Shahid *et al.*, 2019; Piña *et al.*, 2010), selección de individuos superiores (Khadivi *et al.*, 2019) y evaluación de híbridos interespecíficos (Santos *et al.*, 2012).

3.5.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas genéticas importantes, utilizadas por los mejoradores de plantas para detectar variación genética en colecciones de germoplasma, lo que permite entender la dinámica del genoma y mejorar la eficiencia del cruzamiento (Jain *et al.*, 2010).

Esencialmente, los marcadores de ADN pueden revelar diferencias genéticas que se pueden visualizar mediante la técnica de electroforesis en gel y tinción con productos químicos (bromuro de etidio o plata) o la detección con sondas radioactivas o colorimétricas. Los marcadores de ADN son particularmente útiles si revelan diferencias entre individuos de la misma especie o de diferentes especies. Los genes o marcadores que están muy juntos o estrechamente vinculados se transmitirán de padres a la progenie con más frecuencia que los genes o marcadores que se encuentran más separados (Collard *et al.*, 2005).

Dentro de los marcadores moleculares basados en ADN podemos encontrar RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random amplified

polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) y SSR (Simple sequence repeats).

3.5.2.1 SSR (Simple sequences repeats)

Uno de los marcadores moleculares más utilizados son SSR conocidas también como microsatelites, ya que son descritos como co-dominantes (Levitus *et al.*, 2010), multi-alélicos y altamente reproducibles (Oliveira *et al.*, 2006). Están basados en la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), la cual amplifica el segmento diana del ADN en varios órdenes de magnitud a través de ciclos repetitivos (Kalle *et al.*, 2014). La PCR se fundamenta en la replicación del ADN realizada por la enzima ADN polimerasa, la cual sintetiza una cadena complementaria de ADN en sentido 5´ a 3´ utilizando una cadena molde y cebadores (primers) que son fragmentos de ADN complementarios al ADN que se desea amplificar (Mas *et al.*, 2016).

Los marcadores SSR han sido utilizados en diferentes programas de mejoramiento genético o de conservación vegetal para estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional dentro y entre los géneros (Ali *et al.*, 2019); para conocer la divergencia genética entre especies (Raza *et al.*, 2019); la variabilidad genética entre poblaciones poliploides derivadas de individuos diploides (De Carvalho *et al.*, 2019); e incluso conocer la variabilidad genética entre accesiones para verificación de posibles duplicados en el germoplasma (Sochor *et al.*, 2019).

Bonamico *et al.*, (2014) implementaron el uso de marcadores moleculares SSR para conocer la variabilidad entre parentales e híbridos, en su trabajo caracterizaron molecularmente 19 híbridos de maíz con la ayuda de 17 iniciadores SSR, los que permitieron obtener 61 bandas polimórficas las cuales fueron analizadas posteriormente para calcular la distancia genética entre la población.

3.6 Cultivo *in vitro* del género *Eustoma*

La producción a escala comercial se encuentra limitada por la falta de uniformidad de plántulas, lo que afecta su calidad como material para comercializar (Winarto *et al.*, 2015). Una de las herramientas para enfrentar esta limitante es el cultivo de tejidos vegetales, herramienta que actualmente está asociada a programas de mejoramiento genético, ya que nos permite multiplicar masivamente a las plantas a través de procesos de organogénesis adventicia, el cual implican la regulación de la división celular, expansión celular, diferenciación de tipo celular y tisular, llegando a formar el patrón del órgano en su totalidad (De Smet, 2013); Además, en un proceso de cultivo *in vitro* se puede regenerar embriogénesis somática, la cual implica la producción de estructuras similares a embriones a partir de células somáticas, sin fusión de gametos (Suarez y Bozhkov, 2008). En el género *Eustoma* se ha reportado que es posible inducir organogénesis somática utilizando diferentes tipos de explante (Tabla 5).

Tabla 5. Explante, medio utilizado y tipo de regeneración reportado en cultivo *in vitro* en el género *Eustoma*.

Explante utilizado	Medio de cultivo	Órgano obtenido	Número promedio	Longitud promedio (cm)	Autor
Yemas laterales	Número: MS+ 0.1 mg/l BA + 0.2 mg/l ANA Longitud: MS+ 0.1mg/l BA	Brotes	5.8	2.07	Kaviani <i>et al.</i> , 2014
Brotes	Número: MS+ 0.2 mg/l BA + 0.2 mg/l ANA, MS+ 0.2 mg/l BA + 2 mg/l ANA, MS+ 0.2 mg/l ANA. Longitud: MS + 0.2 mg/l BA	Raíces	14.53	3.87	
Segmentos nodales (1.5 cm) con yemas auxiliares.	MS + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA	Brotes	Echo lavender: 4.08 Flamenco White: 6.15 Mirage Pastel Pink: 6.91	1.37 1.48 1.98	Pop <i>et al.</i> , 2016
Brotes	1.5 mg 1-1 IBA	Raíces	Echo lavender: 10.7 Flamenco White: 38.2 Mirage Pastel Pink: 57.4	-----	
Hojas jóvenes (4 meses de edad) 0.5x0.5cm.	B5 + 0.1 mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP	Callo	-----	-----	Shintiavira <i>et al.</i> , 2015
Callo	B5 + 0.1 mg/l 2,4 D y 0.5 mg/l BAP	Brotes	18.7	-----	
Brotes con 5 cm de longitud y 3 pares de hojas.	MS+ 2mg/l IAA +1 g/l CA	Raíces	1.90	1.85	
Primera y segunda hoja de brote lateral.	MS + 3.0 mg/l TDZ y 0.3 mg/l ANA	Callo	-----	-----	

					Winarto et al., 2015
Callo	3 mg/l TDZ+0.01 mg/l ANA		Brotes	8.4	-----
	Numero: 0.1 mg/l BA y 0.02 mg/l de ANA				
Brotes	Longitud: 0.1 mg/l BA+0.1 mg/l ANA		Raíces	3.9	2.3

El éxito del cultivo *in vitro* está regido por una serie de factores ambientales como el genotipo. Zhou *et al.*, 2014 reportaron que el genotipo influye en la capacidad organogénica, por lo que resulta importante conocer el potencial organogénico de cada híbrido para saber si es factible para la producción de plantas a gran escala.

Se han realizado diversos trabajos para conocer el efecto que tiene el genotipo en los procesos de organogénesis y embriogénesis en cultivo *in vitro*, en los cuales se afirma que la capacidad organogénica está estrechamente relacionada con el genotipo (Rodríguez *et al.*, 2000; Naranjo *et al.*, 2016; Vasconcelos *et al.*, 2016).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La utilización de plantas de *Eustoma grandiflorum* tiene gran aceptación por parte de los consumidores debido a las características ornamentales que presenta, lo cual la ha posicionado como una de las principales especies de alto valor comercial. Sin embargo, esta especie tiene la desventaja de presentar arrosetamiento y aborto floral a temperaturas mayores de 25°C, lo que representa una gran pérdida en la producción y limita el cultivo de esta especie a ciertas zonas del país.

5. JUSTIFICACIÓN

Eustoma es una planta ornamental cuyo interés comercial ha crecido en los últimos años, por lo que se ha generado interés en realizar mejoramiento genético para obtener variedades con nuevas características. Entre estas características se encuentra la obtención de nuevos colores y nuevas formas de flor y capacidad de adaptación de las plantas para crecer en regiones con altas temperaturas (mayores a 35°C). Es por este motivo que, en el año 2015-2017 se realizó mejoramiento genético en CIATEJ, dando como resultado la obtención de híbridos con nuevos colores y formas. En este trabajo los híbridos generados en CIATEJ en las condiciones de clima de Jalisco se establecieron y evaluaron en Yucatán, con la finalidad de seleccionar híbridos que crezcan y florezcan en las condiciones ambientales de Yucatán, lo cual permitirá diversificar la actividad florícola de la región sureste de México.

6. HIPÓTESIS

Los híbridos resultados de la cruce de *Eustoma exaltatum* x *Eustoma grandiflorum* serán capaces de adaptarse a las condiciones ambientales de Yucatán en

temperaturas promedio de $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Además, el uso de marcadores moleculares y morfológicos permitirá conocer la variación genética entre los diferentes híbridos del género *Eustoma*, lo cual permitirá realizar una selección adecuada de aquellos individuos sobresalientes.

7. OBJETIVOS

General

Caracterizar morfológica y molecularmente a híbridos del género *Eustoma* establecidos en cultivo *in vitro* y *ex vitro*.

Específicos

- Obtener plantas *in vitro* y *ex vitro* como fuente de explante para evaluar el comportamiento morfogénico de 13 híbridos del género *Eustoma*.
- Conocer la capacidad de obtener organogénesis adventicia y enraizamiento *in vitro* de 13 híbridos del género *Eustoma*.
- Conocer las diferencias morfológicas entre 13 híbridos en condiciones *ex vitro*.
- Conocer los diferentes perfiles genéticos de las líneas sobresalientes mediante el uso de marcadores moleculares SSR (Simple Sequences repeats).

8. METODOLOGÍA

8.1 Estructura de descomposición del trabajo (WBS).

El presente proyecto está conformado por tres etapas: establecimiento *in vitro* y *ex vitro*, caracterización morfológica y caracterización molecular de híbridos del género *Eustoma*, cada una de las etapas con sus respectivas subetapas se presentan en la Fig. 4.

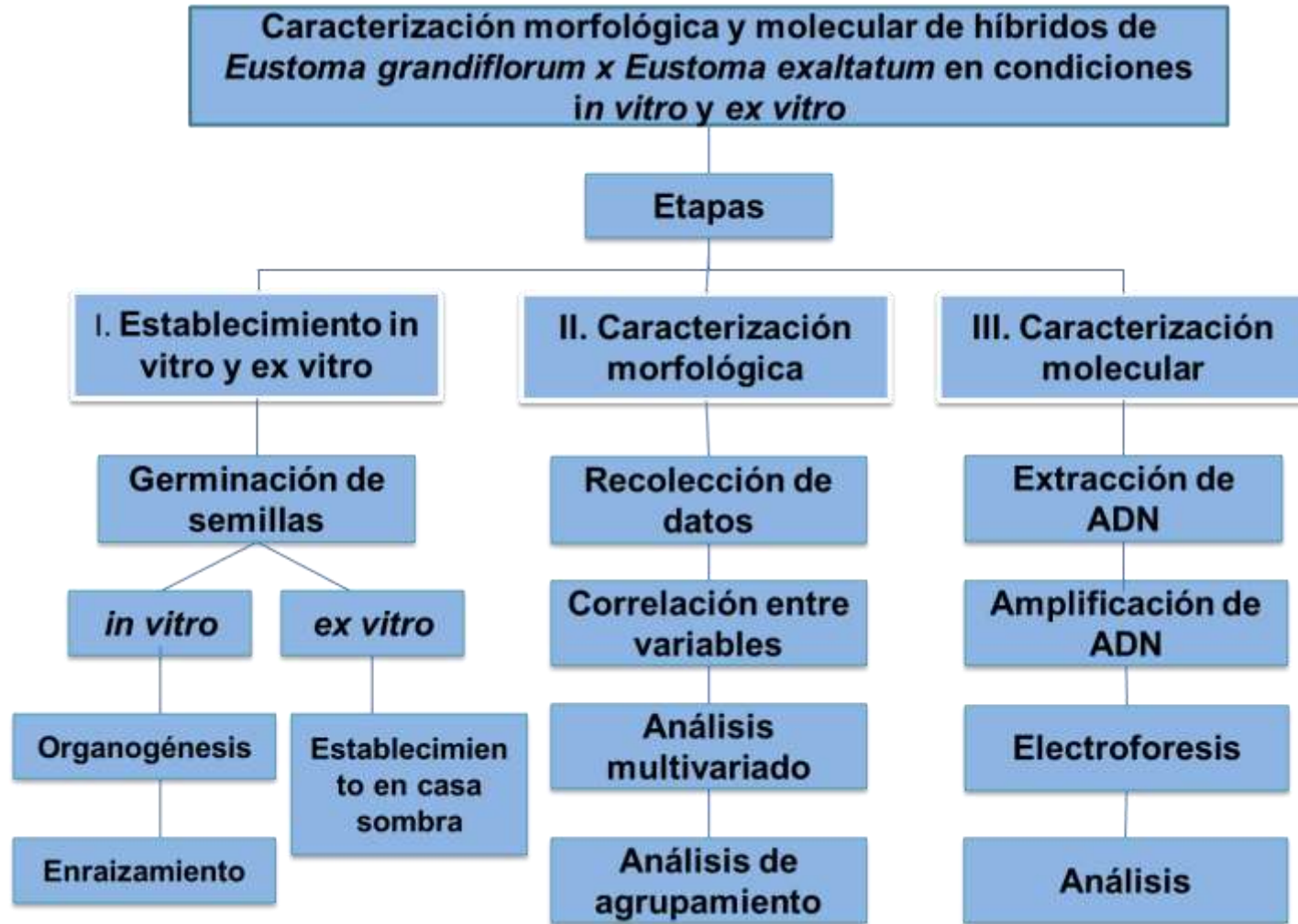


Figura 4. Esquema general de proyecto: Caracterización morfológica y molecular de híbridos de *Eustoma exaltatum* x *Eustoma grandiflorum* en condiciones *in vitro* y *ex vitro*.

8.2 obtención del material vegetativo

El material vegetativo utilizado fueron 13 híbridos, obtenidos a partir de la cruce entre *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* (Tabla 6). Las semillas de los híbridos fueron proporcionadas por la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado Jalisco, A.C subsede Zapopan.

Tabla 6. Líneas híbridas del género *Eustoma* obtenidas a partir de la autopolinización (S1) de individuos de retrocruzamiento 1 (BC1).

Líneas híbridas	Autopolinización (S1)		
	Parental	Parental masculino	Parental femenino
1512025	1312116-09	1112009-013	White 3-4
1512029	1312116-17	1112009-013	White 3-4
1512063	1312059-07	1112009-048	Rose 2-2
1512070	1312014-08	1112009-048	Purple 2-2
1512072	1312014-02	1112009-048	Purple 2-2
1512082	1312132-22	1212098-002	Blue Rim 2-3
1512093	1312077-11	1212098-001	Blue 2-3
1512095	1312107-22	1212013-010	Lavander
1512096	1312107-21	1212013-010	Lavander
1512098	1312050-08	1112009-135	Green 2-3
1512013	1312038-04	1112009-112	Lavander
1512105	1312132-23	1212098-002	Blue Rim 2-3
1512100	1312014-05	1112009-048	Purple 2-2

8.3 Establecimiento en cultivo *in vitro* y *ex vitro*

8.3.1 Cultivo *in vitro* de semillas híbridas de *Eustoma*

La germinación de semillas en cultivo *in vitro* utilizando la metodología de Barba *et al.*, (2015), la cual utiliza medio MS a 1/10 de su fuerza única, suplementado con 3 g/l de sacarosa y 4 g/l de phytigel™ sin reguladores de crecimiento a un pH de 5.8. Las semillas fueron sometidas a desinfección, realizando enjuagues con agua destilada para retirar partículas presentes, posteriormente las semillas se pasaron a hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos y finalmente se hicieron 3 enjuagues de 5 minutos cada uno, con agua destilada estéril. Las condiciones del cultivo *in vitro* fueron a una temperatura de 23 ± 2 ° C, humedad relativa (HR) de 60% y fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad.

Análisis estadístico

La germinación de las semillas se evaluó a los 21 días después del establecimiento, tomando como variable el porcentaje de germinación (%). Los datos fueron analizados por el software estadístico Statgraphics, utilizando la prueba LSD (Least significant difference) a un nivel de significancia del 5% para realizar la comparación de medias.

8.3.2 Morfogénesis de hojas de plántulas híbridas de *Eustoma* desarrolladas *in vitro*

8.3.2.1 Inducción de organogénesis adventicia

Para la inducción de brotes adventicios, se usaron explantes de hoja obtenidas de plántulas de 7 semanas de cultivo *in vitro*, las hojas fueron cortadas de 10mm² aproximadamente y colocadas en medio basal MS (4.4 g/L), sacarosa (0.3%) (p/v), AG₃ (1.44 μM), BAP (4.44 μM), Gelrite (2.3%) (p/v) y pH (5.8). Durante la inducción

de organogénesis, el cultivo fue colocado a un fotoperiodo de 16 h luz y a temperatura de 23°C. El experimento estuvo comprendido por 12 tratamientos, correspondiente a los híbridos del género *Eustoma* (Barba *et al.*,2017). Todos los tratamientos se hicieron por cuadruplicado. El número y la longitud de brotes fueron evaluados a los 60 días de cultivo *in vitro*.

8.3.2.2 Enraizamiento de brotes adventicios

Los brotes con 3 cm de longitud obtenidos en la etapa de organogénesis adventicia, fueron transferidos a medio de enraizamiento, cuya formulación consistió en medio basal MS al 100% de su fuerza iónica, sacarosa 30 g/l, ANA (1.074 μ M), carbón activado 1.0 g/L y pH 5.8. El cultivo fue mantenido a un fotoperiodo de 16 h luz y temperatura de 23°C. Los tratamientos evaluados durante esta etapa correspondieron a los 12 híbridos, tomando como variable de respuesta el número de raíces y longitud de raíces a los 60 días después de la resiembra en medio de enraizamiento. Cada tratamiento estaba constituido por 4 réplicas.

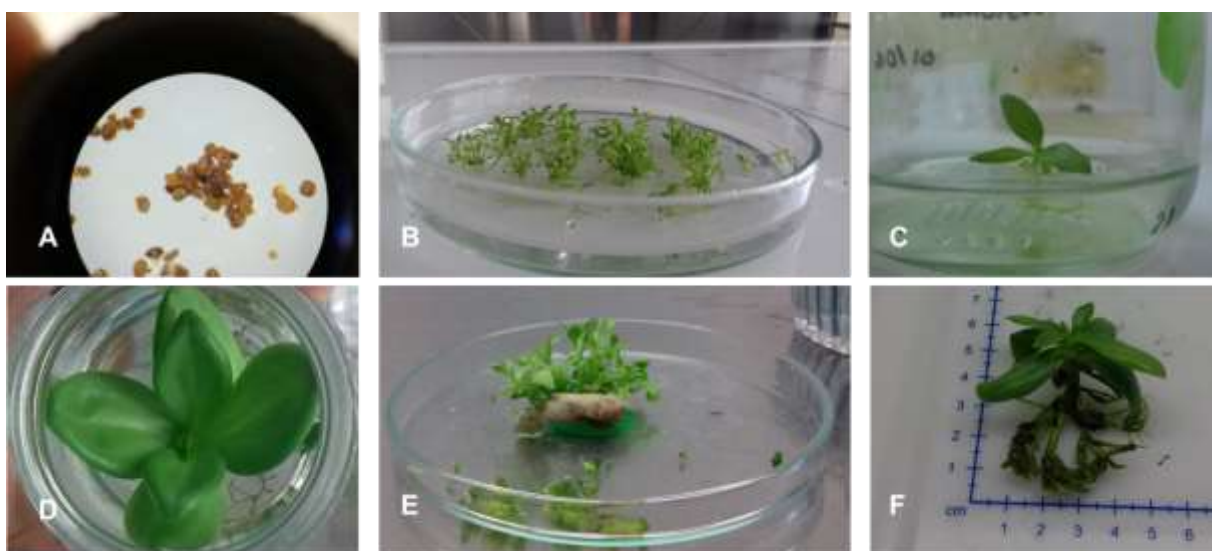


Figura 5. Propagación *in vitro* de híbridos del género *Eustoma*. (A) Semillas híbridas. (B) Germinación después de 21 días. (C) Plántulas con cinco semanas de

desarrollo. (D) Plántulas como fuente de explante para organogénesis directa. (E) Brotes obtenidos después de 60 días de cultivo (F) Brotes en etapa de enraizamiento después de 60 días de cultivo.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por el software estadístico Statgraphics, utilizando la prueba LSD a un nivel de significancia del 5% para realizar la comparación de medias.

8.3.3 Cultivo *ex vitro* en condiciones casa sombra

Para la aclimatación de plántulas provenientes de la germinación de semillas en cultivo *in vitro*, se seleccionaron 4 individuos de cada uno de los 13 híbridos (Barba *et al*, 2017), considerando el tamaño de la plántula, aproximadamente de 5- 8 cm, con 4 pares de hojas desarrolladas (Fig. 6A). Las plántulas *in vitro* fueron retiradas del medio de cultivo y se realizó un enjuague con agua destilada a la parte radicular, con el fin de remover cualquier exceso de medio; posteriormente, se efectuó un enjuague con solución fúngica de Binolate® 1g/L. Las plántulas fueron colocadas en contenedores con Agrolita y suelo orgánico a una proporción de 1:1, el sustrato fue previamente esterilizado durante 20 minutos a 121°C a 15 lb/pulg². Durante 15 días, fueron protegidas con bolsas de nylon transparente y colocadas en el cuarto de cultivo a un fotoperiodo de 16 h luz y a una temperatura de 23°C (Fig. 6C); posteriormente, las bolsas transparentes fueron retiradas y las plántulas fueron llevadas a casa sombra (Fig. 6D). Durante el proceso de aclimatación hasta el desarrollo completo de las plantas, se tomaron registros de temperatura, humedad relativa (HR) y luminosidad en condiciones de casa sombra; se registraron 2 periodos de floración, el primer periodo comprendió los meses de Septiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre y el segundo periodo de los meses de Marzo, Abril, Mayo, Junio, Julio. Las condiciones de temperatura, humedad relativa (%) y luminosidad se presentan en la Tabla 7.



Figura 6. Proceso de cultivo en condiciones de casa sombra de híbridos del género *Eustoma*: (A) Planta de 5 cm para cultivo *ex vitro*. (B) Riego de plántulas. (C) Plántulas en cuarto de cultivo protegidas por una bolsa de nylon. (D) Plántulas en casa sombra después de 15 días. (E) Plantas en etapa de floración.

Tabla 7. Condiciones de Temperatura en el establecimiento *ex vitro* de híbridos del género *Eustoma*.

Mes	Temperatura am	Temperatura pm	HR% am	HR% pm	Luminosidad (Lx) am	Luminosidad (Lx) pm
Septiembre	28.5	36.8	61.7	47.17	137.2	120.00
Octubre	27.9	35.8	78.31	52.95	103.28	81.33
Noviembre	25.8	34.1	73.61	63.8	103.55	62.37
Diciembre	23.7	32.7	67.8	51.8	103.9	31.5
Enero	24.21	26.54	71.56	46.57	75.00	51.16
Febrero	29.36	33.64	59.00	36.11	103.73	85.58
Marzo	29.9	35.78	48.56	32.00	122.43	127.83
Abril	29.42	44.22	56.07	31.7	96.63	225.25
Mayo	31.78	44.4	62.7	41.3	92.68	261.6
Junio	31.86	43.7	68.3	44.2	92.93	220.35

HR: Humedad relativa; Lx: lux.

8.4 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó con base en la guía TG/197/1 para la descripción varietal de *Eustoma* (Tabla 8), establecido por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV). Se estableció un código para cada carácter con el objetivo de facilitar su manejo.

La medición de características morfológicas fue realizada en el periodo Marzo a Junio 2019.

Tabla 8. Características morfológicas establecidas por la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV) para el género *Eustoma*.

Código	Característica
LPL	Altura de la planta (cm)
DT	Diámetro del tallo (mm)
NSEG	Número de nudos
LNH	Longitud de hojas (cm)
ANH	Anchura de hoja (cm)
PH	Porte de hoja en relación al tallo
CH	Color de hoja
FH	Forma de hoja
NF	Número de flores
TF	Tipo de flor
LNF	Longitud de flor (cm)
DF	Diámetro de la flor (cm)
FF	Forma de flor
NP	Número de pétalos
LNP	Longitud de pétalo (cm)
ANP	Anchura de pétalo (cm)

FP	Forma de pétalo
OP	Ondulación de pétalo
FBP	Fleco del borde de pétalo
NCO	Número de colores
CP	Color de pétalo
LNCAL	Longitud del cáliz (cm)
LNPED	Longitud de pedicelo (cm)
NES	Número de estambres

Siguiendo lo descrito por la guía TG/197/1 para la descripción varietal de *Eustoma*, las observaciones de hoja se efectuaron en la tercera hoja a partir de la parte superior; las observaciones de flor y del pedicelo se efectuaron en la segunda flor que se abrió y en su cara interna; la longitud del entrenudo se midió en el cuarto entrenudo a partir de la parte superior (Fig. 9D).

Las observaciones de color, se realizaron mediante el colorímetro HunterLab MiniScan EZ, que registra datos en la escala CIELab (L = luminosidad, -a/+a = escala de verde a rojo, -b/+b escala de azul a amarillo), durante la antesis en 3 pétalos por flor.

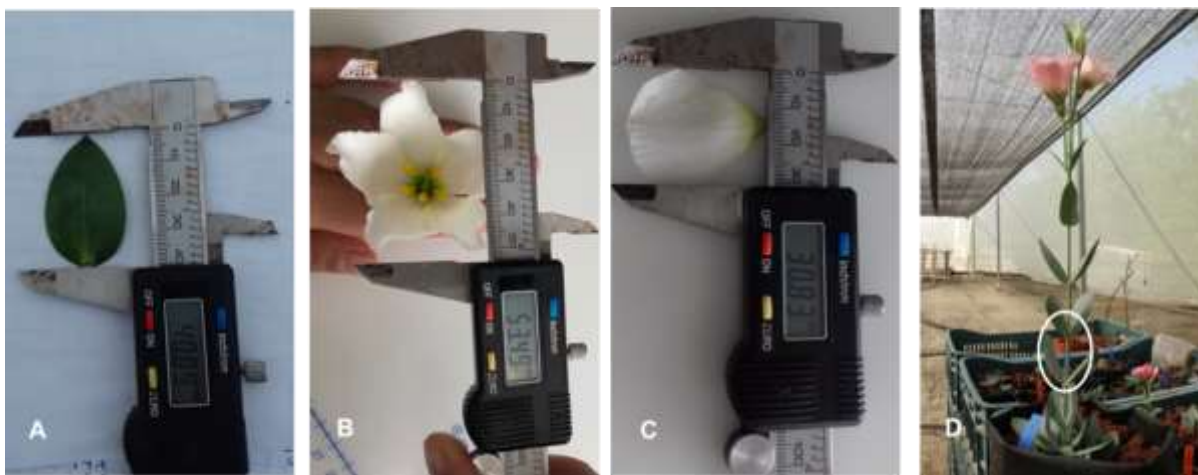


Figura 7. Caracterización morfológica de híbridos del género *Eustoma*: (A) Evaluación longitudinal de la parte foliar. (B) Evaluación del diámetro floral. (C) Evaluación de la anchura de pétalos. (D) Evaluación de las características del tallo a partir del cuarto entrenudo.

Análisis estadístico

Se evaluaron 14 caracteres cuantitativos y 10 caracteres cualitativos (Tabla 8). Los datos de caracteres morfológicos se analizaron mediante el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2000). Se realizó un análisis de componentes principales con el fin de representar relaciones jerárquicas entre los híbridos, posteriormente, se realizó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Euclidea con base en la proyección de componentes principales y el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) para la agrupación de las unidades taxonómicas. Para la selección de individuos sobresalientes, se realizó un agrupamiento de todos los individuos que conforman cada línea híbrida, es decir se tomaron en cuenta los valores separados de hermanos completos, lo anterior fue hecho utilizando el software PRIMER v6 (Clarke, 2006).

8.5 Caracterización molecular de híbridos

Para la caracterización molecular se utilizaron un conjunto de 10 iniciadores SSR (Tabla 9), los cuales fueron reportados *in silico* por Sathisskumar *et al.* (2011) para especies de la familia de las Gentianaceae.

Tabla 9. Marcadores moleculares SSR reportados para la familia de las Gentianaceae.

Número de accesión	Primer forward	Tm (°C)	Primer reverse	Tm (°C)
hb8809	GAGAAGCCATAGGAGGTC	51.6	CGCAATACTCTCGTGACTION	55.3
dq3987	GACGCTGTAAAGTGCCAAC	54.3	GTAGGCGTAACTCTGACAC	52.4
ax0288	GGTCATTACTCGGGGTGTG	55.3	GCACTCTCACATCACATTGG	58.6
af2407	GGTGGAGGGCATAGAGGC	57.9	GGTGGAGGGCATAGAGGC	57.9
ab2716	GTAGCAGCAGTGTGGTCGGC	61	GATTTTCAGACAACGACGGTG	53.8
d14589	GGCTGTTGAAATGGCGG	57.4	GAGCGTTTATTCTGGGGC	53.7
ef5692	CTGTGTGATGCTGAGGTTGC	56.5	GGCTGAACCACGGGACAACC	61.2
ab1901	CGGGTCCTTGCGATGCCTGGG	65.5	CGTCCTCCTTCTCCACTGCC	59.9

ef5629	CTTCTCCACGGTCGCCTTAC	57.7	GTGACTGAAGCATCCTACC	52.6
ab0807	CATAGGAAGGCAAGGAAGC	53.2	GATTCAGGTAGCAACGGAGT GG	57.6

8.4.1 Extracción de ADN genómico

De acuerdo al análisis morfológico, se seleccionaron 4 híbridos sobresalientes (1512063, 1512096, 1512098, 1512100) y el híbrido con menor rendimiento en los caracteres de importancia ornamental (1512093). El ADN genómico se extrajo de los tejidos de hojas frescas proveniente de plántulas establecidas ex vitro, utilizando el kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit. La maceración del tejido se realizó por medio de nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero. La calidad y la concentración del ADN extraído se midieron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con tinción de 2 µl de solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml en H₂O ((Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) (p/v) con ayuda de un fotodocumentador UVP.

8.4.2 Amplificación de PCR

Se realizó una mezcla de 25 µl para PCR, conteniendo 1.5 µl de ADN genómico, 2.5 µl Buffer PCR 10xMgCl₂ (Invitrogen™), 1 µl de 50 mM MgCl₂, 2µl de 0.2 mM de cada uno de los dNTP's (Invitrogen™), 1 µl de 10 µM primer, 5U/µl de Taq polimerasa (Invitrogen™) y 1 µl de DMSO. La amplificación de PCR fue realizada usando un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler). Los ciclos de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 94°C durante 4 min, 35 ciclos (Desnaturalización a 94°C durante 40 seg, Alineamiento de acuerdo a la T_m de cada primer durante 40 seg, extensión a 72°C durante 2 min) y una extensión final a 72°C durante 5 min. El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v).

Análisis estadístico

Para estudiar la diversidad genética se estimaron los parámetros: número observado de alelos (N_a), número efectivo de alelos (N_e), porcentaje de loci polimórficos (PPL), heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e); además se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). Estos análisis se realizaron con el software GENALEX 6 (Peakall *et al.*, 2006).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Establecimiento en cultivo *in vitro*

Durante el proceso de regeneración *in vitro*, tanto en la germinación, la organogénesis y en el proceso de enraizamiento, los híbridos presentaron diferencia significativa en relación al genotipo.

La respuesta de los diferentes híbridos en la germinación *in vitro* es presentada en la tabla 10. El mayor porcentaje de germinación fue observado en el híbrido 1512025 y 1512098 con $67.23\% \pm 0.37$ y 66.19 ± 0.671 respectivamente.

Tabla 10. Respuesta genotípica en la germinación *in vitro* de híbridos de *E. exaltatum* x *E. grandiflorum*.

Híbrido	Media de porcentaje de germinación \pm DE
1512025	67.23 ± 0.37

1512029	27.21 ±0.089
1512063	35.20 ±0.495
1512070	17.89 ±0.551
1512072	40.59 ±0.176
1512082	41.84 ±0.466
1512093	34.99 ±0.608
1512095	58.90 ±0.269
1512096	64.30 ±0.601
1512098	66.19 ±0.671
1512105	07.54 ±1.251
1512013	24.24 ±0.622
1512100	34.07 ±0.042

DE: Desviación estándar

En el proceso de organogénesis, todos los diferentes híbridos presentaron diferencias en la longitud y número de brotes, la mayoría de los explantes produjeron brotes en la zona de corte (Fig. 10).

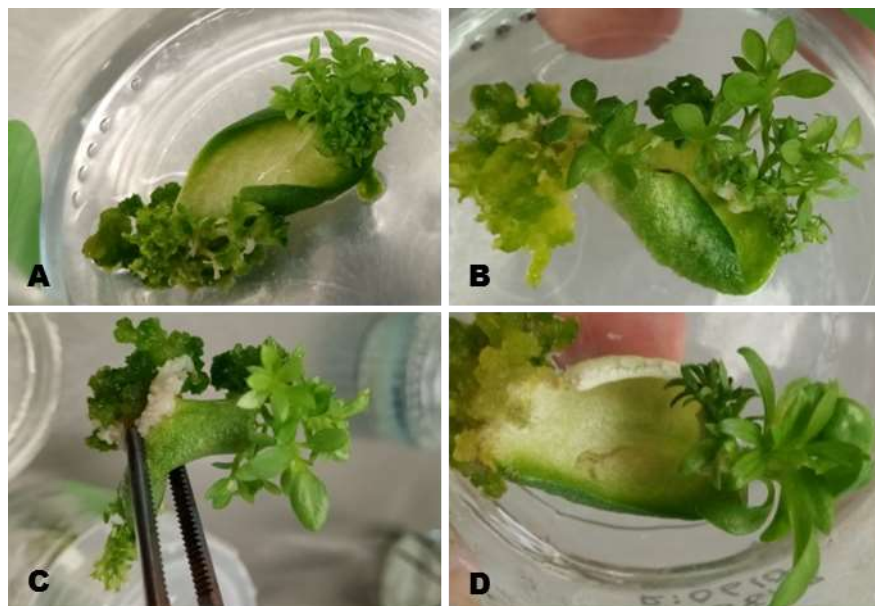


Figura 8. Organogénesis adventicia de brotes formada en híbridos del género *Eustoma* a los 60 días de cultivo *in vitro*: (A) Brotes formados en los bordes del explante foliar del híbrido 1512095 con una media en número de brotes de 16.91; (B) Explante del híbrido 1512096 con una media en número de brotes de 18.00; (C)

y (D) Explantes del híbrido 1512072 con una media en longitud de brotes de 1.25 cm.

El máximo número de brotes obtenidos fueron en los híbridos 1512095 y 1512096 con 16.91 ± 4.25 y 18 ± 4.76 brotes por explante respectivamente, a los 60 días de cultivo (Tabla 11). Anteriormente esta variable ha sido evaluada en *E. grandiflorum* por Kaviani *et al.*, (2014) obteniendo un máximo de número de brotes por explante de 5.80 en medio 0.1 mg L^{-1} BA con 0.2 mg L^{-1} ANA. Es importante mencionar que la capacidad organogénica está controlada por una serie de factores entre los cuales destacan la cantidad de hormonas de crecimiento en los explantes, esto puede causar una marcada diferencia en el proceso de organogénesis.

En la variable longitud de brotes, los valores máximos fueron obtenidos en el híbrido 1512072, la media en longitud de brotes fue de 1.09 ± 0.14 cm de altura, a los 60 días de cultivo (Tabla. 11). Los resultados obtenidos difieren con los obtenidos por Kaviani *et al.*, (2014) en *Eustoma grandiflorum*, la mayor longitud de brotes fue de 2,07 cm por planta en medio suplementado con $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

Tabla 11. Respuesta genotípica de híbridos del género *Eustoma* en la regeneración de brotes adventicios en cultivo *in vitro*.

Híbridos	Regeneración de brotes adventicios		Regeneración de raíces	
	Media de Número de brotes \pm DE	Media de Longitud de brotes \pm DE	Media de Número de raíces \pm DE	Media de Longitud de raíces \pm DE
1512025	02.17 ± 1.94 ab	0.34 ± 0.33 ab	2.75 ± 1.28 abc	2.35 ± 1.65 abc
1512029	06.67 ± 1.70 abcd	0.55 ± 0.08 abcd	4.25 ± 1.83 cde	2.03 ± 1.04 abc
1512063	07.00 ± 2.41 abc	0.78 ± 0.16 cd	2.38 ± 1.68 ab	1.16 ± 0.76 a
1512070	09.25 ± 5.89 cd	0.61 ± 0.16 bcd	3.62 ± 1.50 bcde	3.41 ± 1.52 cde
1512072	10.67 ± 3.75 d	1.25 ± 0.23 e	5.00 ± 1.85 e	4.81 ± 1.55 e
1512082	05.58 ± 3.98 abcd	0.69 ± 0.19 bcd	2.75 ± 1.58 abc	1.70 ± 1.25 ab
1512093	03.58 ± 3.84 abc	0.49 ± 0.30 abc	3.75 ± 1.16 bcde	2.97 ± 1.99 bcd
1512095	16.91 ± 4.25 e	0.78 ± 0.16 cd	5.12 ± 2.69 e	3.97 ± 2.24 de

1512096	18.00 ±4.76 e	0.92 ±0.27 de	3.00 ±1.77 abcd	2.06 ±1.29 abc
1512098	06.33 ±0.94 abcd	0.60 ±0.06 abcd	4.75 ±2.76 de	3.21 ±2.22 bcd
1512013	01.08 ±1.12 a	0.21 ±0.24 a	1.38 ±2.32 a	0.95 ±1.61 a
1512105	-----	-----	-----	-----
1512100	06.00 ±3.54 abcd	0.73 ±0.31 bcd	4.13 ±1.12 bcde	4.32 ±0.92 de

DE: desviación estándar.

Durante el enraizamiento de brotes adventicios obtenidos a partir de organogénesis adventicia, se obtuvo un mayor número de raíces en los híbridos 1512029, 1512072, 1512095, 1512098 y 1512100 con una media de 4.25 ± 1.83 , 5.00 ± 1.85 , 5.12 ± 2.69 , 4.75 ± 2.76 , 4.13 ± 1.12 respectivamente. En contraste con Kaviani *et al.*, (2014), cuyo mayor número de raíces fue de 14.53 por planta.

En la variable de respuesta longitud de raíces, la mejor respuesta se presentó en los híbridos 1512072 con 4.81 ± 1.55 cm y 1512100 con 4.32 ± 0.92 cm (Tabla 11). Los resultados obtenidos concuerdan con el trabajo realizado por Kaviani *et al.*, (2014), en el cual obtuvo como mayor número longitud de raíces 3.87 por planta en medio MS suplementando con 0.2 mg L^{-1} ANA.

Las diferentes respuestas que presentó cada híbrido en las etapas de desarrollo confirma que la capacidad organogénica está relacionada directamente con el genotipo, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2001), quienes estudiaron la regeneración de plantas *in vitro* de 5 diferentes genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y afirmaron que existe diferencia en la capacidad organogénica dada por las diferentes respuestas de los genotipos estudiados. Por otra parte, Burbulis *et al.*, (2012) después de analizar el efecto de los medios de cultivo y los genotipos sobre la regeneración de brotes adventicios en cultivares de *Linum usitatissimum* L., indican que la regeneración de brotes a partir de hipocotilos, fue afectado por el genotipo, sugiriendo el uso de una combinación específica de reguladores de crecimiento para cada genotipo.

La diferencia en la respuesta de organogénesis para cada híbrido puede ser atribuida a las concentraciones de reguladores de crecimiento endógenas en los explantes, lo que, a su vez, puede explicar una marcada diferencia en el proceso de organogénesis. Pérez *et al.*, (2014) estudiaron la relación entre el contenido de

hormonas endógenas y la inducción de brotes adventicios en cultivares de callos de melocotón y portainjertos, los resultados obtenidos sugieren que la diferencia en la capacidad de organogénesis somática en los cultivares se ve notablemente afectada por el contenido de reguladores endógenos, los cuales difieren entre los genotipos.

9.2 Caracterización morfológica

9.2.1 Valoración de caracteres morfológicos en híbridos del género *Eustoma*.

De acuerdo al análisis de varianza estadístico de los valores obtenido en la caracterización morfológica de los híbridos del género *Eustoma* se obtuvieron diferencia estadísticamente significativa entre los híbridos, a excepción de la variable DT: Diámetro del tallo y PH: porte de la hoja en relación al tallo en donde los datos no muestran diferencia alguna en relación al tipo de híbrido.

Los híbridos 1512063, 1512095, 1512096, 1512098 presentaron valores altos en las características relacionadas al porte de la planta como la altura de la planta (LPL) y número de segmentos nodales (NSEG), en estas mismas variables, los valores menos se presentaron en los híbridos 1512070, 1512093, 1512029 (Tabla 11).

En la característica número de flores (NF), los híbridos en los cuales se observaron los valores mayores fueron en 1512096, 1512098, por el contrario, los valores menores fueron observados en 1512070, 1512093. Otra de las características de importancia en las flores de corte es la longitud de pedicelo (LNPED) en la cual los valores más altos fueron dados por 1512063, 1512082, 1512100 y los valores más bajos en el híbrido 1512070.

En los caracteres asociados al tamaño de la flor como longitud de flor (LNF) y anchura de flor (ANF), los valores más altos de presentaron en los híbridos 1512063, 1512098, 1512100 y los valores más bajos en los híbridos 1512070, 1512093, 1512105.

Por su parte, la característica longitud de pétalos (LNP) obtuvo el valor más alto en el híbrido 1512100 y los valores más bajos en los híbridos 1512070, 1512105. En la anchura de pétalo (ANP) los valores más altos fueron observados en los híbridos 1512072, 1512093 y 1512093 y el valor más bajo en el híbrido 1512070.

En el análisis ANOVA de cada uno de los caracteres, los coeficientes de variación más altos se presentaron en los caracteres NF y FF (65.99 y 49.13 %, respectivamente) y FH (43.95%), por otra parte, los coeficientes de variación más bajos se observaron en los caracteres NES y CH con 10.89 y 10.69 respectivamente (Tabla 12).

En análisis de correlación de las variables usadas en la caracterización de híbridos del género *Eustoma*, se obtuvieron 12 relaciones significativas que se consideraron aquellas con valores de "r" superiores a 0.7 (Tabla 13,14, 15). Dentro de las correlaciones significativas es importante mencionar aquellas relacionadas con el porte de la planta como NSEG-LPL con valor de $r = 0.7321$ cuyo coeficiente positivo indica que ambas variables tienden a aumentar a la vez. Así también, se obtuvo correlación significativa en caracteres florales como NP-TF con valor de $r = 0.9996$, NES-TF con valor de $r = -1.000$ y NES-NP con valor $r = -0.999$, en estos dos últimos, el coeficiente negativo indica que una variable disminuye a medida que otra aumenta, por decir que a mayor número de pétalos que indica una flor tipo doble, el número de estambres presente es menor.

Tabla 12. Descripción y estadísticos básicos para caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados en híbridos de *E. grandiflorum* x *E. exaltatum*.

Carácter	Híbridos												Media	Min	Max	DS	CV%	Error %
	1512025	1512029	1512063	1512070	1512072	1512082	1512093	1512095	1512096	1512098	1512105	1512100						
LPL	22.25	26.53	40.41	13.78	29.68	30.13	21.43	38.65	34.75	42.94	23.37	28.68	29.91	11.89	51.00	11.03	37.77	1.59
DT	4.07	3.48	3.06	3.20	5.27	3.81	4.06	3.49	3.21	4.06	3.09	4.16	3.75	2.12	9.53	1.32	35.38	0.19
NSEG	7.75	6.25	8.75	6.25	6.75	6.00	5.25	8.75	9.75	10.25	7.00	8.75	7.62	5.00	12.00	1.74	22.89	0.25
PH	1.00	1.00	1.25	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.06	1.00	3.00	0.31	30.11	0.04
LNH	3.39	3.68	4.54	3.39	5.09	5.18	4.20	4.33	4.60	4.48	5.27	6.22	4.61	3.19	7.15	0.84	18.30	0.12
ANH	1.62	1.73	2.54	2.21	2.81	2.41	2.98	2.22	2.40	2.07	2.22	3.05	2.35	1.54	3.52	0.49	21.12	0.07
CH	41.78	48.70	38.76	42.80	50.46	48.92	44.04	48.75	44.62	48.69	45.56	46.87	45.37	37.89	56.88	4.89	10.69	0.73
FH	1.00	1.00	2.25	3.00	2.00	2.00	3.00	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.77	1.00	3.00	0.77	43.95	0.11
NF	1.50	2.75	3.75	1.50	2.50	2.25	1.00	4.00	5.25	6.00	2.50	3.25	3.02	1.00	7.00	1.65	65.59	0.28
TF	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.08	1.00	2.00	0.27	25.78	0.04
LNF	4.02	4.10	4.96	3.79	4.81	4.50	3.26	3.71	4.44	5.06	3.43	5.59	4.30	2.86	5.92	0.76	17.83	0.11
NP	5.00	5.00	13.75	5.00	5.25	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.75	5.00	15.00	2.52	43.86	0.36
DF	4.58	4.78	6.15	3.87	5.21	4.09	3.42	3.46	4.16	5.16	3.65	5.98	4.54	3.17	6.59	0.95	18.37	0.11
FF	1.00	2.00	2.75	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	1.50	3.00	3.00	1.00	1.68	1.00	3.00	0.82	49.13	0.12
LNP	3.55	4.28	5.05	3.31	4.41	4.78	3.51	3.70	4.18	5.02	3.44	5.65	4.24	3.22	5.81	0.77	49.13	0.12
ANP	2.41	2.50	3.28	2.37	2.77	3.12	3.48	3.26	2.53	4.13	2.70	3.70	3.02	2.34	4.33	0.57	18.94	0.08
FP	3.00	2.00	3.25	3.00	2.00	2.00	1.00	2.00	3.25	3.00	3.00	3.00	2.54	1.00	4.00	0.71	28.06	0.10
OP	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.75	1.25	1.00	1.25	1.27	1.00	2.00	0.44	35.33	0.06
FBP	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.25	1.25	2.00	1.00	1.12	1.00	2.00	0.33	29.70	0.04
NCO	2.00	1.75	1.00	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.25	1.00	1.00	1.25	1.00	2.00	0.43	35.00	0.06
CP	91.49	92.14	85.38	77.67	80.79	89.23	53.66	87.84	89.53	88.64	83.95	85.05	84.04	49.16	97.20	11.20	13.33	1.61
LNCAL	2.12	2.06	2.39	1.33	3.13	2.62	1.94	2.04	2.30	2.48	2.16	2.53	2.26	1.32	4.83	0.56	24.80	0.08
LNPED	2.54	3.36	5.37	1.47	4.29	4.75	2.79	3.35	3.28	4.05	3.41	5.10	3.65	1.29	7.10	1.24	34.09	0.17
NES	5.00	5.00	3.25	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.25	5.00	5.00	5.00	4.87	3.00	6.00	0.53	10.89	0.07

DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

Tabla 13. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género *Eustoma*.

	LPL	DT	NSEG	PH	LNH	ANH	CH	FH
LPL	1							
DT	0.1102	1						
NSEG	0.7321 **	-0.0664	1					
PH	-0.0920	0.2084	0.2203	1				
LNH	0.1891	0.4392	0.2470	0.6756 *	1			
ANH	0.0139	0.3384	-0.0931	0.4906	0.5346	1		
CH	0.1958	0.5258	-0.0560	0.0928	0.2467	0.0558	1	
FH	-0.2626	-0.1765	-0.4219	-0.3133	-0.4213	0.4231	-0.2482	1
NF	0.8466 **	-0.0739	0.8888 **	0.0476	0.1458	-0.0741	0.2158	-0.3528
TF	0.4059	-0.2936	0.2203	-0.0909	-0.0319	0.1306	-0.6301 *	0.1044
LNF	0.4964	0.3593	0.5571	0.5687	0.5488	0.2875	0.1497	-0.3787
NP	0.4073	-0.2737	0.2159	-0.0937	-0.0263	0.1401	-0.6196 *	0.1077
DF	0.3797	0.2903	0.4240	0.4854	0.3918	0.1898	-0.1184	-0.418
FF	0.6307 *	-0.1139	0.3189	-0.1974	-0.1212	-0.1967	-0.0792	-0.2268
LNP	0.5601	0.3095	0.4568	0.5829*	0.5861 *	0.3620	0.2085	-0.3800
ANP	0.5543	0.2953	0.3899	0.3786	0.3851	0.4472	0.2140	-0.1126
FP	0.1157	-0.3810	0.6290 *	0.2335	0.1830	-0.3022	-0.3792	-0.4472
OP	-0.2542	-0.1296	0.1510	0.3568	0.2599	-0.2988	-0.0807	-0.6441*
FBP	-0.2120	-0.2799	-0.1224	-0.0909	0.2502	-0.0953	-0.0240	-0.3133
NCO	-0.2023	0.0728	-0.3594	-0.1741	-0.1418	-0.5880 *	0.1088	-0.3333
CP	0.4028	-0.1166	0.5312	0.0936	0.1865	-0.5665	0.1948	-0.6943 *
LNCAL	0.5138	0.7341 **	0.2445	0.2079	0.6992 *	0.3647	0.4611	-0.3624
LNPED	0.6302 *	0.3270	0.3313	0.4067	0.7005 *	0.4337	0.1897	-0.3493
NES	-0.4059	0.2936	-0.2203	0.0909	0.0319	-0.1306	0.6301 *	-0.1044

* Correlación significativa a un nivel de 0.05 de significancia; ** Correlación significativa a un nivel de 0.01 de significancia. LPL: longitud de la planta; DT: diámetro del tallo, NSEG: número de segmentos nodales; PH: porte de la hoja; LNH: Longitud de hoja, ANH: Anchura de hoja; CH: color de hoja; FH: Forma de Hoja; NF: número de flores; TF: tipo de flor; LNF: longitud de flor; NP: número de pétalos; DF: diámetro de flor; FF: forma de flor; LNP: longitud de pétalo; ANP: Anchura de pétalo; FP: Forma de pétalo; OP: ondulación de pétalo; FBP: forma de borde del pétalo; NCO: número de colores; CP: color de pétalo; LNCAL: longitud de cáliz; LNPED: longitud de pedicelo; NES: número de estambres.

Tabla 14. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género *Eustoma*.

	NF	TF	LNF	NP	DF	FF	LNP	ANP
NF	1							
TF	0.1514	1						
LNF	0.5197	0.2897	1					
NP	0.1486	0.9996 **	0.2968	1				
DF	0.3255	0.5428	0.8840**	0.5505	1			
FF	0.4790	0.5922 *	0.4496	0.5878 *	0.5175	1		
LNP	0.5047	0.3348	0.9341 **	0.3376	0.8227 **	0.5625	1	
ANP	0.4394	0.1445	0.4483	0.1408	0.3203	0.4669	0.6065 *	1
FP	0.4112	0.2335	0.4162	0.2274	0.4157	0.1690	0.2213	-0.1158
OP	0.0170	-0.2548	0.0126	-0.2627	0.0828	-0.3320	-0.0232	-0.3950
FBP	-0.1081	-0.0909	-0.3879	-0.0937	-0.3014	-0.1974	-0.3307	-0.1788
NCO	-0.3396	-0.1741	-0.0841	-0.1794	-0.0383	0.1260	-0.0290	-0.3673
CP	0.4974	0.0432	0.4580	0.0406	0.3666	0.2808	0.3675	-0.1774
LNCAL	0.3193	0.0932	0.6553 *	0.1113	0.5378	0.2231	0.6551 *	0.3297
LNPED	0.3953	0.4822	0.7458 **	0.4884	0.6953 *	0.5134	0.8735 **	0.5522
NES	-0.1514	-1.000 **	-0.2897	-0.999 **	-0.5428	-0.5922 *	-0.3348	-0.1445

* Correlación significativa a un nivel de 0.05 de significancia; ** Correlación significativa a un nivel de 0.01 de significancia. NF: número de flores; TF: tipo de flor; LNF: longitud de flor; NP: número de pétalos; DF: diámetro de flor; FF: forma de flor; LNP: longitud de pétalo; ANP: Anchura de pétalo; FP: Forma de pétalo; OP: ondulación de pétalo; FBP: forma de borde del pétalo; NCO: número de colores; CP: color de pétalo; LNCAL: longitud de cáliz; LNPED: longitud de pedicelo; NES: número de estambres.

Tabla 15. Coeficiente de correlación entre caracteres morfológicos en híbridos del género *Eustoma*.

	FP	OP	FBP	NCO	CP	LNCAL	LNPED	NES
FP	1							
OP	0.3928	1						
FBP	0.2335	0.3568	1					
NCO	-0.1491	0.2928	-0.1741	1				
CP	0.5989 *	0.4131	0.0001	0.4047	1			
LNCAL	-0.0522	-0.0442	-0.0717	0.0092	0.2671	1		
LNPED	0.0659	-0.0852	-0.0662	-0.0518	0.2970	0.7863**	1	
NES	-0.2335	0.2548	0.0909	0.1741	-0.0432	-0.0932	-0.4822	1

* Correlación significativa a un nivel de 0.05 de significancia; ** Correlación significativa a un nivel de 0.01 de significancia; FP: Forma de pétalo; OP: ondulación de pétalo; FBP: forma de borde del pétalo; NCO: número de colores; CP: color de pétalo; LNCAL: longitud de cáliz; LNPED: longitud de pedicelo; NES: número de estambres.

A partir del análisis de componentes principales, se seleccionaron los primeros 4 componentes principales, los cuales explican el 75.65% de la variación total (Tabla 16).

Tabla 16. Valores propios y porcentaje de la variabilidad para los primeros 4 componentes principales en el análisis de híbridos del género *Eustoma*.

Componente principal	Valor propio	Varianza (%)	Varianza acumulada (%)
1	7.71	32.12	32.12
2	3.99	16.64	48.76
3	3.66	15.26	64.02
4	2.32	9.68	73.70

Los 4 componentes principales están conformados por 18 de los 24 caracteres, el CP1 explicó el 32.65 % conformado por 8 caracteres, de los cuales 2 se relacionan al porte de la planta (LPL y NSEG) y el resto a caracteres florales (NF, LNF, DF, LNP, LNCAL, LNPED); el CP2 abarca el 17.90% de la varianza y está conformado por 4 caracteres, de los cuales 1 es característica foliar y el resto se vincula con caracteres florales (TF, NP, NES) (Tabla 17).

Tabla 17. Vectores propios de caracteres cuantitativos y cualitativos que integran los primeros 4 componentes principales en el análisis de híbridos del género *Eustoma*.

Carácter	CP1	CP2	CP3	CP4
LPL	0.7438	0.1538	0.0648	0.5428
DT	0.2796	-0.7315	0.1709	0.0481
NSEG	0.6331	0.1634	-0.3343	0.3374
ANH	0.3474	-0.4215	0.5136	-0.5552
FH	-0.3624	0.1448	0.7939	-0.196
NF	0.6284	0.124	-0.1992	0.5343
TF	0.5342	0.7183	0.2332	-0.2739
LNF	0.8888	-0.1578	-0.1471	-0.0623
NP	0.5389	0.7091	0.2407	-0.2782
DF	0.8392	0.0839	-0.1337	-0.2294
LNP	0.9218	-0.1852	-0.0609	-0.0302
ANP	0.6489	-0.2835	0.3611	0.1935
FP	0.3062	0.4097	-0.6355	-0.1533
OP	-0.1195	-0.0935	-0.8772	-0.1994
CP	0.1748	-0.1379	0.6832	-0.091
LNCAL	0.6811	-0.4331	-0.053	0.0056
LNPED	0.8919	-0.1311	-0.003	-0.1205
NES	-0.5342	-0.7183	-0.2332	0.2739

LPL: longitud de la planta; DT: diámetro del tallo, NSEG: número de segmentos nodales; ANH: Anchura de hoja; FH: Forma de Hoja; NF: número de flores; TF: tipo de flor; LNF: longitud de flor; NP: número de pétalos; DF: diámetro de flor; LNP: longitud de pétalo; ANP: Anchura de pétalo; FP: Forma de pétalo; OP: ondulación de pétalo; CP: color de pétalo; LNCAL: longitud de cáliz; LNPED: longitud de pedicelo; NES: número de estambres.

Dentro del agrupamiento de los 12 híbridos del género *Eustoma*, se concentraron en 3 grupos, los híbridos 1512063, 1512070, 1512093, 1512098 se consideraron individuos independientes.

El grupo I está formado por los híbridos 1512025, 1512029, 1512105, los cuales presentaron valores bajo en longitud de planta (LPL) de 22.25- 26.53 cm. El grupo II está formado por los híbridos 1512095 y 1512096 los cuales presentaron flores blancas y valores intermedios en longitud de planta (LPL) de 34.75-38.65 cm y longitud de pedicelo (LNPED) de 3.28-3.35 cm. El grupo III está formado por flores

color rosa y altos valores en longitud de pedicelo (LNPED) de 4.29 a 5.10 cm y valores en longitud de planta de (LPL) 26.68 – 30.10 cm.

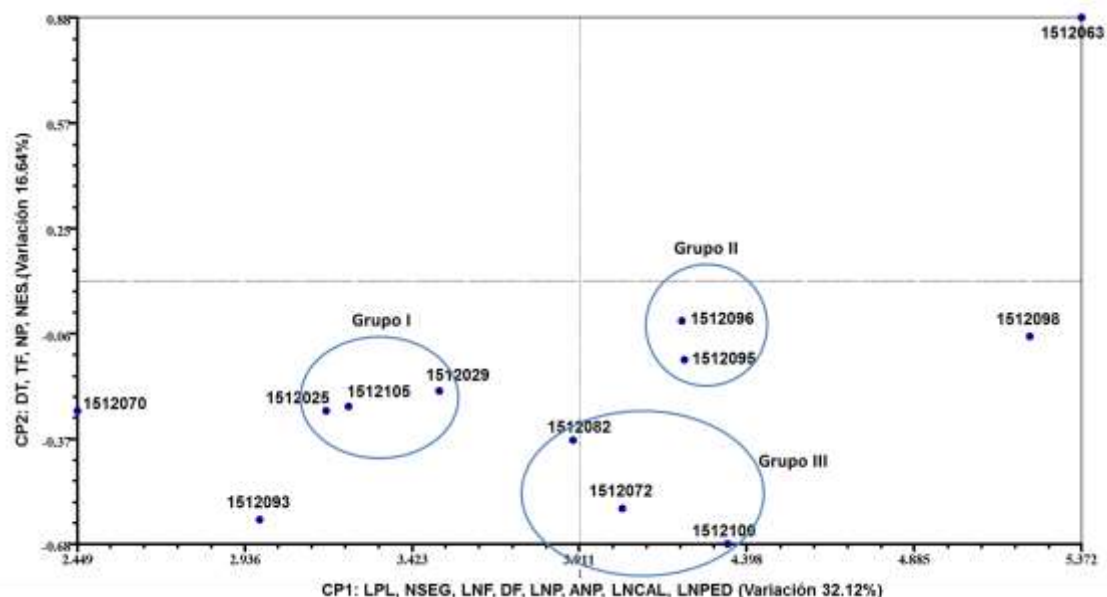


Figura 9. Gráfico de saturación del análisis de componentes principales entre caracteres morfológicos e híbridos del género *Eustoma*.

Se ordenaron a los 12 híbridos del género *Eustoma* mediante el método UPGMA, utilizando el coeficiente de Euclídea sobre el espacio de los componentes principales (Figura 12.)

Durante el ordenamiento de los híbridos, se observó una distribución relacionada a rendimientos en caracteres ornamentales de importancia en cultivo de corte. El Grupo A estaba integrado en su mayoría por híbridos que presentaron mayor longitud de planta (LPL), valores altos en NF, LNF, DF, NSEG. Por otra parte, el grupo B estaba integrado por híbridos con valores intermedios y bajos en las características de LPL, NF, LNF, DF, NSEG.

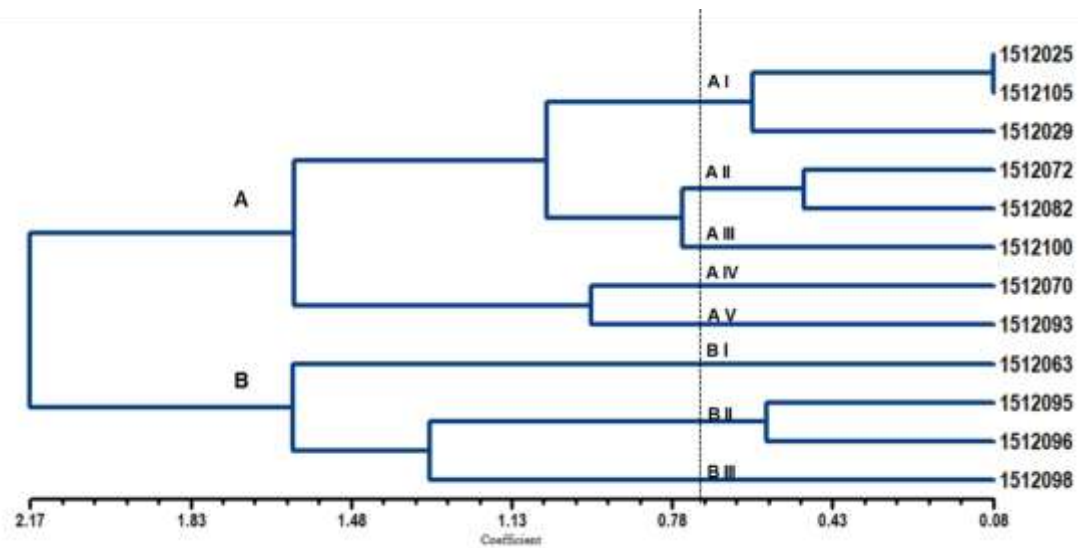


Figura 10. Dendrograma de híbridos del género *Eustoma* basado en los primeros cuatro componentes, mediante la distancia taxonómica promedio usando el método de agrupamiento UPGMA.

A una distancia de 0.71 se observaron ocho grupos (A I a A V y B I a B III), los híbridos 1512100, 1512070, 1512093, 1512063, 1512098 formaron un a los grupos AIII, AIV, AV, BI, BIII respectivamente, lo que indica independencia con el resto de los híbridos.

9.2.2 Selección de individuos sobresalientes en híbridos del género *Eustoma*.

Los individuos de cada tipo de híbrido del género *Eustoma*, es decir hermanos completos, fueron agrupados de acuerdo a los caracteres de importancia para flor de corte como los son la altura de planta, número de yemas florales, longitud de flor, diámetro de flor, color de flor y longitud de pedicelo, estas variables fueron divididos en 3 rangos, a excepción del color, para agrupar a los individuos pertenecientes a cada híbrido. Dentro de los híbridos 1512063, 1512098, 1512095 se encontraron individuos con altura de hasta 51 cm que se posicionan dentro de la categoría Alto (Fig. 13A), resultados que concuerdan con Uddin *et al.*, (2015) quien evaluó el comportamiento de 8 variedades de *Eustoma grandiflorum* entre los meses de

Febrero a Octubre con una temperatura aproximadamente de 28.4 – 31.3 °C, cuyos valores más altos en longitud de plantas fueron de 58.9 cm, los cuales son agrupado en la categoría Alto; valores reportados por Uddin *et al.*, (2013) cuya evaluación de variedades fueron durante los meses de Noviembre a Julio se obtuvieron plantas con una altura máxima de 46 cm que las ubica en el subgrupo Medio; estos valores, difieren con los reportados por Ahmed (2016) quien analizó el rendimiento de 15 líneas de *Lisianthus*, cuyos valores máximos en longitud de planta abarcan plantas de 68.8 a 65.9 cm de longitud.

Los híbridos como 1512095, 1512096 y 1512098 presentaron individuos con mayor número de flores que los colocaron en el subgrupo de Mucho con valores de 7 yemas florales por individuo (Figura 13B), al igual que Uddin *et al.*, (2015) cuyo número de flores máximo fue de 8 y Ahmed (2016) reporta un número de flores máximo de 9.

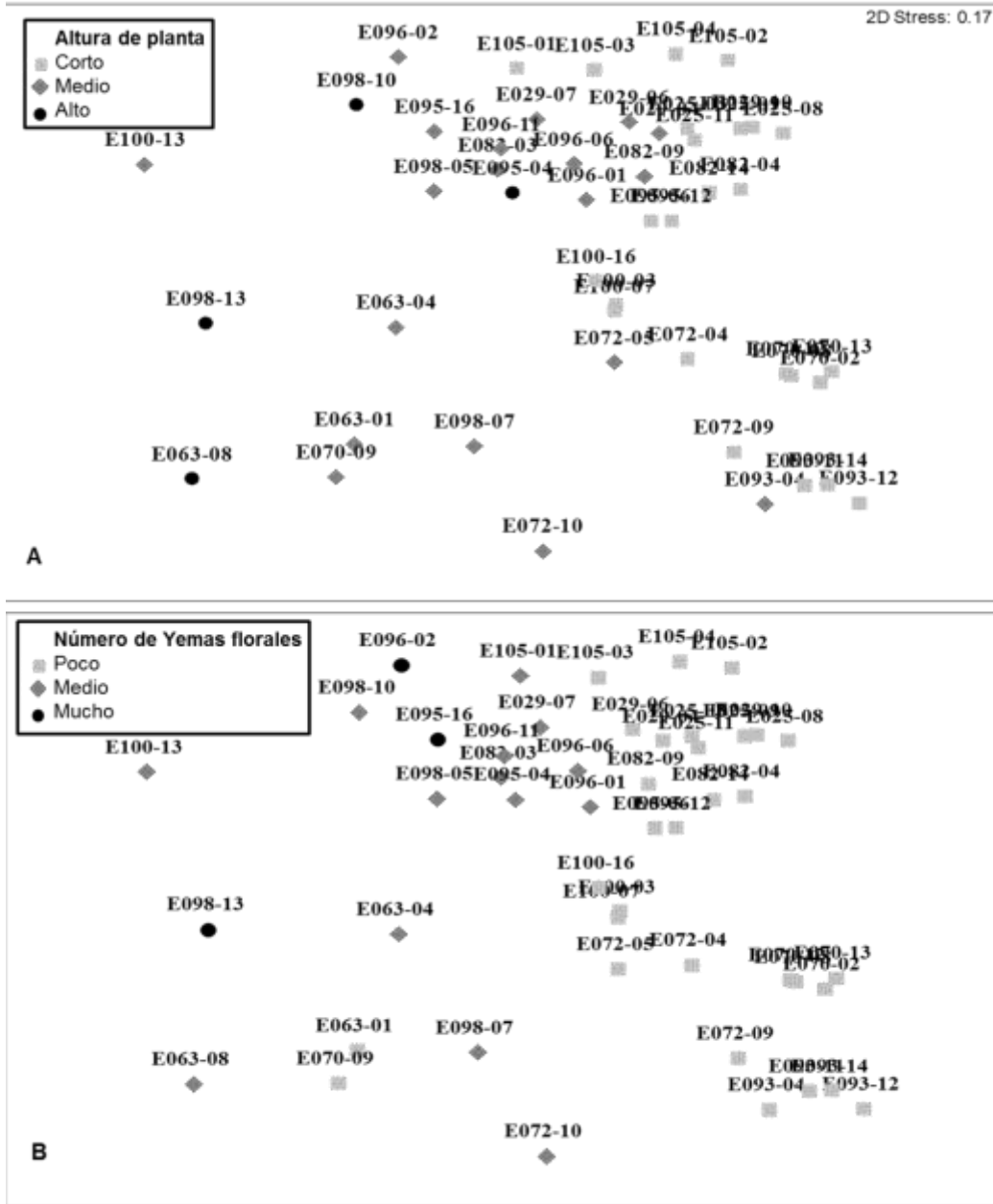


Figura 11. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a Altura de planta (Corto: 11-29.03 cm, Medio: 29.03-47.07cm, Alto: 47.06-65.06cm). B) De acuerdo a número de yemas florales: Poco: 0-3.33 flores; Medio: 3.33 – 6.66 flores; Muchos 6.66-10 flores.

El tamaño de la flor es un carácter importante en el mercado ornamental de corte, dentro de estas variables se encontraron individuos pertenecientes a los híbridos 1512063, 1512072, 1512098, 1512100 cuyos valores máximos en longitud de flor fueron de hasta 5.92 cm, posicionándolos en el subgrupo Largo (Fig. 14A), estos datos son similares a lo obtenido por Uddin *et al.*, 2015. El valor máximo en diámetro de flores fue de 6.59 cm dentro del rango de Largo (Fig. 14 B); datos obtenidos por Ahmed (2016) indican un diámetro de flor máximo de 7.3 cm y Uddin *et al.*, (2015) reporta el valor máximo dentro de flores con diámetro de 7.1cm.

Dentro de los híbridos del género *Eustoma* se obtuvieron una diversidad de colores que van de flores unicolores a bicolors (Fig. 15A). En la variable longitud de pedicelo dentro del subgrupo Long, se encontraron individuos con un máximo en longitud de pedicelo de hasta 7.1 cm (Fig. 15B) dentro de los híbridos 1512063 y 1512100.

La agrupación de las figuras 13, 14 y 15 muestra a individuos de un mismo híbrido en diferentes categorías, esta variación entre hermanos completos, proviene de la heterocigosidad existente entre los parentales, lo que genera una mayor diversidad dentro de la progenie.

De acuerdo a la agrupación por características de importancia en el mercado ornamental, se seleccionaron a los híbridos 1512063, 1512096, 1512098, 1512100 como híbridos sobresalientes.

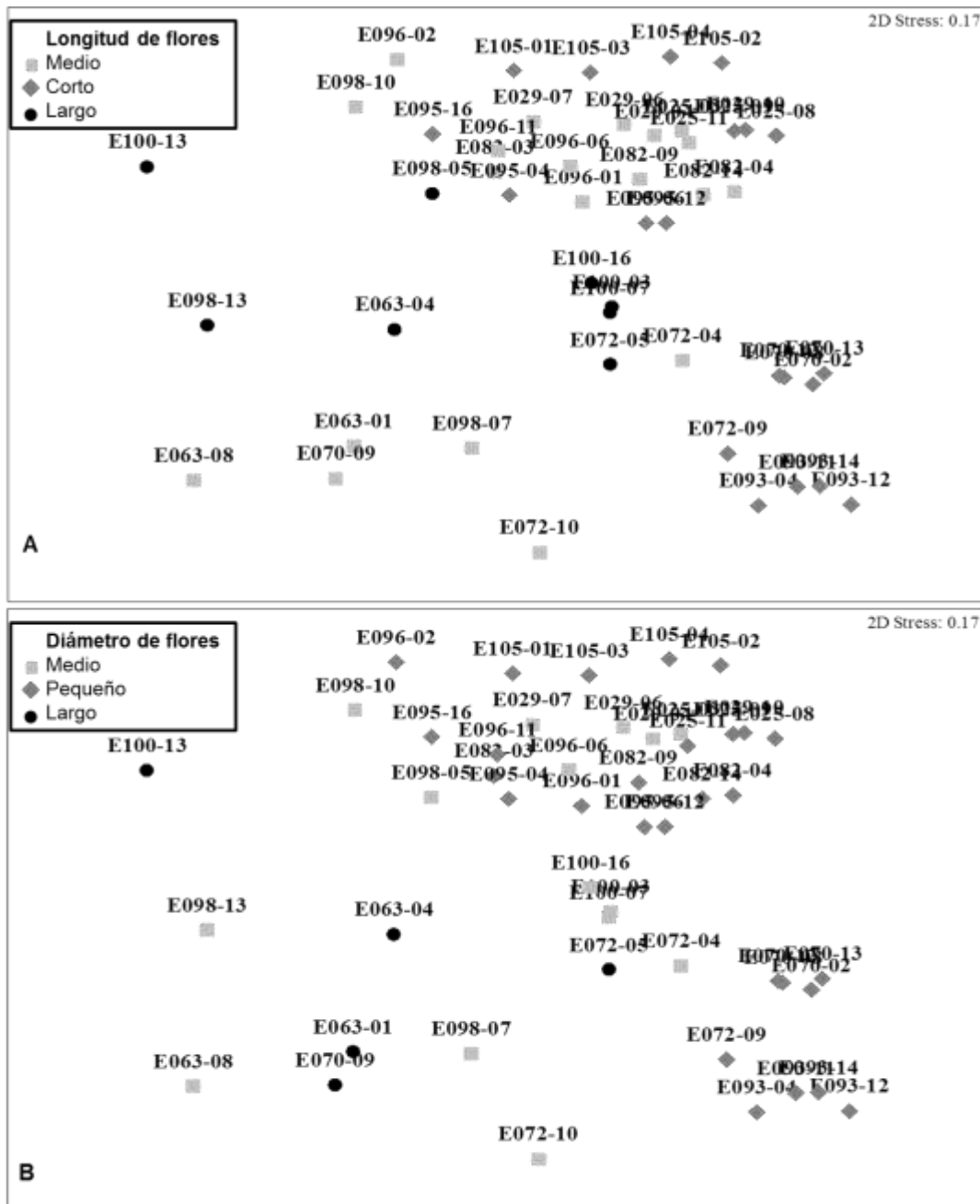


Figura 12. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a Longitud de flores (Corto: 2.86 - 4.00 cm, Medio: 4.00 - 5.14 cm, Largo: 5.14 - 6.3cm. B) De acuerdo a Diámetro de flores (Pequeño: 3.2 - 4.6 cm; Medio: 4.6 - 6.0 cm; Largo: 6 - 7.4 cm).

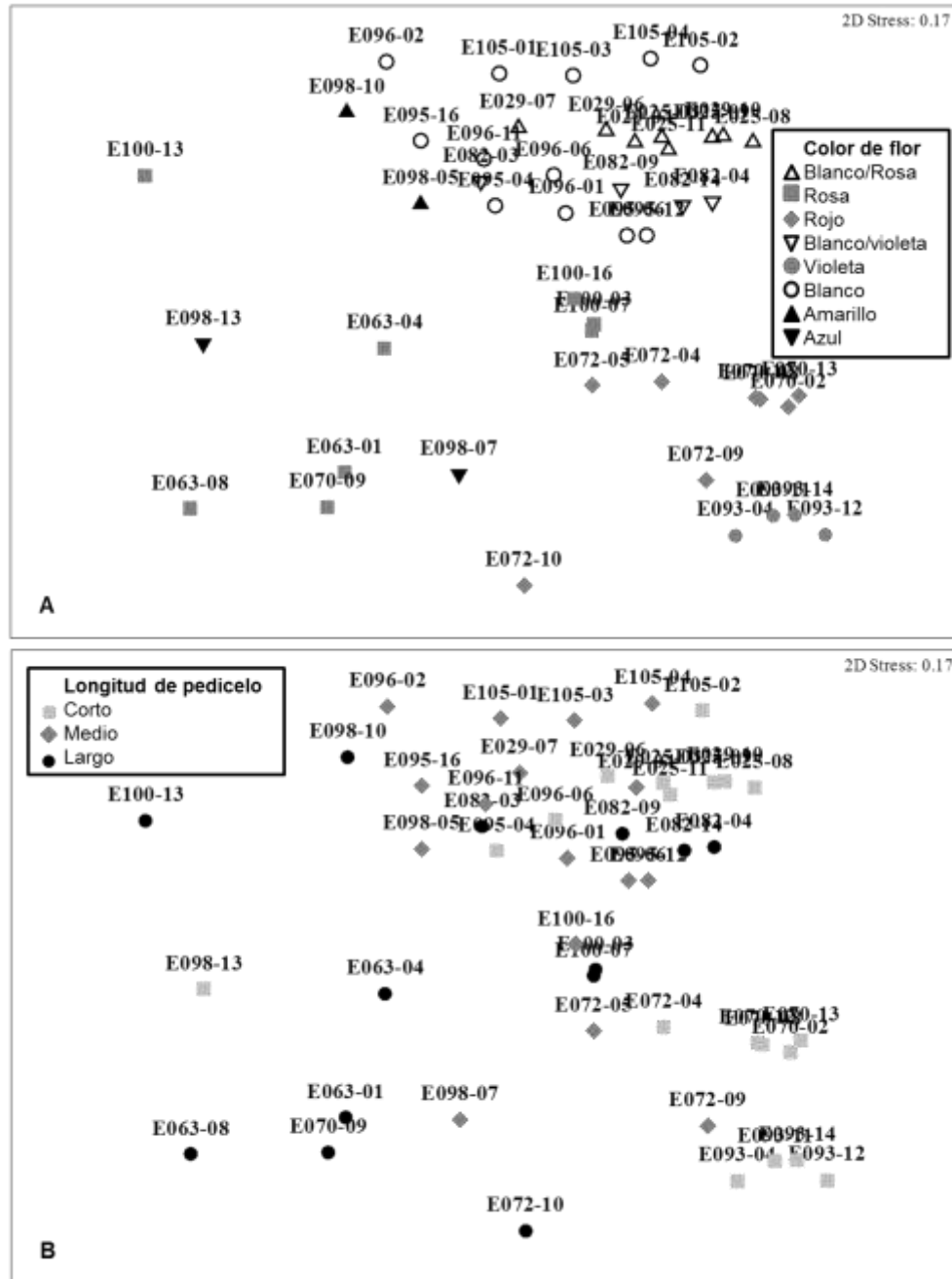


Figura 13. Agrupación de híbridos. A) De acuerdo a color de flor. B) De acuerdo a longitud de pedicelo (Corto: 1.29 – 3.22 cm, Medio: 3.29 – 4.51 cm, Largo: 4.51- 7.1 cm).





9.2.3 Medición colorimétrica de flores en híbridos del género *Eustoma*.





La progenie de algunos de los diferentes híbridos presentó fenotipos florales distintos a sus hermanos completos ya que los individuos que conformaban a cada tipo de híbrido, provenían de diferente semilla. En la Tabla 18 se presentan los diferentes tipos de flores que se presentaron por híbrido,





Los híbridos que presentaron diferentes fenotipos florales en su progenie fueron 1512029, 1512063, 1512095 y 1512098; las diferencias entre hermanos completos se reflejaron principalmente en el color de pétalo y número de colores, estas diferencias están ligadas a la heterocigosidad de los padres.




Bugallo *et al.*, (2017) estudiaron el color de las flores en *P. amethystina*, e híbridos interespecíficos, cuyos resultados colorimétricos reflejaron la variabilidad fenotípica en el color de los diferentes genotipos de especies e híbridos, lo que los llevó a afirmar que el color de las flores es regulado genéticamente y representa una característica relevante en el mejoramiento de plantas ornamentales.

Tabla 18. Medición colorimétrica de flores en híbridos del género Eustoma.

1512025	Tipo de flor	Simple			
	Número de colores	Bicolor			
	Color principal de cara externa	Blanco			
	Color secundario de cara externa	Rosa			
	Color de base	verde			
	Valores colorimétricos de color principal				
	L*	a*	b*		
	84.58	0.76	7.33		
	1512029 Características florales				
	Tipo de flor	Simple			
Número de colores	Bicolor				
Color principal de cara externa	Blanco				
Color secundario de cara externa	Rosa				
Color de base	Verde				
Valores colorimétricos de color principal					
L*	a*	b*			
83.65	-0.1	3.93			
1512029 Características florales					
Tipo de flor	Simple				
Numero de colores	Unicolor				
Color principal de cara externa	Blanco				
Color de base	verde				
Valores colorímetros de color principal					
L*	a*	b*			
91.16	-0.78	6.47			
1512063 Características florales					
Tipo de flor	Doble				
Numero de colores	Unicolor				
Color principal de cara externa	Rosa				
Color de base	Marrón				
Valores colorimétricos de color principal					
L*	a*	b*			
72.01	12.59	-0.55			
1512100 Características florales					
Tipo de flor	Simple				
Número de colores	Unicolor				
Color principal de cara externa	Rosa				
Color base	Purpura				
Valores colorimétricos de color principal					
L*	a*	b*			

	64.22	20.24	-0.33	
Fenotipo de flor por híbrido	Características florales			Ilustración
1512070	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Bicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color de base	Purpura		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	
	55.82	25.33	-2.15	
1512072	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Rosa		
	Color de base	Purpura		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	
	55.11	28.29	-3.92	
1512082	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Numero de colores	Bicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color secundario de cara externa	Violeta		
	Color de base	verde		
	Valores colorímetros de color principal			
	L*	a*	b*	
	82.59	0.34	7.23	
1512093	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Numero de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Violeta		
	Color de base	Verde		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	

	47.23	34.3	-23.19	
1512095	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color base	Verde		
	Valores colorimétricos de color principal			
L*	a*	b*		
	82.35	0.74	4.7	
Fenotipo de flor por híbrido	Características florales			Ilustración
1512095	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color de base	Violeta		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	
	83.36	0.78	4.7	
1512096	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color de base	Verde		
	Valores colorimétricos de color principal			
L*	a*	b*		
	81.54	-1.9	9.03	
1512098	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Numero de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Amarillo		
	Color de base	verde		
	Valores colorímetros de color principal			
L*	a*	b*		

				
	84.67	-2.61	15.14	
1512098	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Numero de colores	Bicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color secundario cara externa	Violeta		
	Color de base	Verde		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	
	65.92	5.18	-8.12	
1512105	Características florales			
	Tipo de flor	Simple		
	Número de colores	Unicolor		
	Color principal de cara externa	Blanco		
	Color base	Verde		
	Valores colorimétricos de color principal			
	L*	a*	b*	
	77.94	-0.35	9.96	

9.3 Caracterización molecular

Como resultado de la amplificación de secuencias microsatélites reportados por Sathishkumar (2011) para la familia Gentianaceae, se lograron obtener 3 secuencias polimórficos, 2 monomórficos y 5 sin amplificar. Las secuencias con polimorfismo en híbridos del género Eustoma, amplificaron bandas de 400 a 1000 pb (Tabla 19).

Tabla 19. Primers polimórficos amplificados en híbridos del género *Eustoma*.

Primers	Tamaño de bandas (pb)
af2407	700-1000
af2716	500-800
ab0807	400-600

Pb: pares de bases.

En el estudio de la diversidad entre 5 híbridos del género *Eustoma*, el porcentaje total de loci polimórficos (PLP) fue de 86.67%, el Numero de alelos diferentes (Na) de 1.867, número de alelos efectivos (Ne) de 1.709, índice de Shannon (I) 0.539, heterocigosidad observada (Ho) de 0.650 y Heterocigosidad esperada (He) de 0.377, los cuales se muestran en la tabla 20. Entre los cinco híbridos existe un PLP entre el 100% y el 66.67% y se encontraron valores de I entre 0.452 a 0.693. los valores más altos de PLP (100%) se encontraron en los híbridos 1512063, 1512096, 1512100, este último presentó el valor más alto en I=0.693 y Ne=2.00. Los valores más bajos de PPL (66.67%) se presentaron en los híbridos 1512093, 1512098, el valor más bajo de I se encontró en el híbrido 1512093 con 0.452.

Parámetros genéticos fueron reportados por Bernand *et al.*, (2018) quienes utilizaron 13 marcadores SSR para evaluar la diversidad y estructura en una colección de germoplasma de nuez, los valores obtenidos en la heterocigosidad esperada (He) de las 217 accesiones de *J. regia* fue mayor que la heterocigosidad observada (Ho), indicando una deficiencia de heterocigotos que los llevó a sugerir la presencia de endogamia pedigrí.

Tabla 20. Parámetros genéticos de híbridos sobresalientes del género *Eustoma*.

Híbridos	PLP %	Na	Ne	I	Ho	He
1512063	100	2.000	1.760	0.588	0.583	0.406
1512093	66.67	1.667	1.627	0.452	0.583	0.323
1512096	100.00	2.000	1.493	0.500	0.417	0.323
1512098	66.67	1.667	1.667	0.462	0.667	0.333
1512100	100	2.000	2.000	0.693	1.000	0.500
Total	86.67	1.867	1.709	0.539	0.650	0.377

PLP: Porcentaje de loci polimórficos; Na: número de alelos diferentes; Ne: número de alelos efectivos; I: índice de Shannon; Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada.

Para el total de los híbridos el coeficiente de diferenciación genética (Fst) obtenido con los 3 primers marcadores microsatélites fue de 0.064, cuyo valor indica un nivel de diferenciación bajo entre los cinco híbridos.

Dotor et al., (2016) realizaron la caracterización de 21 ecotipos genéticos de *Rubus* spp mediante marcadores microsatélites aleatorios RAMs, los valores de coeficiente de diferenciación genética (Fst) con un valor de 0.29 los llevo a concluir que entre los ecotipos se presenta una alta diferenciación genética.

Como resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) sobre la diferenciación genética entre y dentro de los híbridos del genero *Eustoma*, se observó que el 66.91% de la variación genética están relaciones a las diferencias entre híbridos ($p < .001$), cuyo porcentaje fue mayor que dentro de híbridos, cuyas diferencias representaron el 33.09% de la variación genética (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro / entre Híbridos sobresalientes del género *Eustoma* basados en datos de SSR.

Fuente	gl	SC	CM	Est. Var.	Varianza total %	Valor-P
Entre híbridos	4	15.15	3.788	0.843	66.91	0.001
Dentro de híbridos	15	6.25	0.417	0.417	33.09	0.001
Total	19	21.40		1.259	100	

gl: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios.

10. CONCLUSIONES

Los resultados en la evaluación fenotípica de los híbridos del género *Eustoma* nos permitió observar una alta variación en el comportamiento del cultivo a temperaturas altas, el cual está estrechamente relacionada con el genotipo, al igual que el comportamiento en cultivo *in vitro*.

El uso de caracteres morfológicos nos permitió llevar a cabo una selección de híbridos sobresalientes, tomando en cuenta los valores altos en características de importancia en cultivos de flor de corte como los son altura de planta, número de segmentos nodales, número de flor y tamaño de flor. Los individuos con valores más altos se encontraron en los híbridos 1512063, 1512096, 1512098, 1512100, los cuales lograron un alto rendimiento en las condiciones de Mérida, Yucatán. Esto nos indica que los híbridos sobresalientes obtenidos a través de cruza interespecíficas de *E. grandiflorum* y *E. exaltatum* son prometedores para ser

cultivados en regiones con elevadas temperaturas y así lograr una mayor distribución en el cultivo de este género, así como su comercialización.

La caracterización molecular mediante marcadores SSR permitió analizar de forma más puntual el polimorfismo de los híbridos sobresalientes así como su estructura entre dentro de ellos, observando así que la mayoría de la variación genética existente en los individuos estudiados se relaciona a las diferencias entre los híbridos y en menor medida a las diferencias dentro de ellos, los resultados obtenidos dejan una herramienta que a futuro pueda usarse para la detección de redundancias y similitudes en futuras generaciones de los híbridos seleccionados en este proyecto.

PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda una evaluación de homogeneidad y estabilidad para cada uno de los hermanos completos pertenecientes a los híbridos seleccionados. Así también, el uso de otros marcadores moleculares con el fin de ampliar las herramientas para la selección asistida con marcadores moleculares en este género.

Para la parte de propagación a gran escala, se recomienda evaluar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para establecer las condiciones adecuadas para cada tipo de híbrido con el fin de contar con un protocolo de propagación a gran escala para cada uno de los híbridos sobresalientes.

11.REFERENCIAS

Acquaah, G. (2009). Principles of plant genetics and breeding. John Wiley & Sons.

Ahmad, H. (2016). Phenotypic screening of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) lines for production in bangladesh (Doctoral dissertation).

Ali, A., Pan, Y. B., Wang, Q. N., Wang, J. D., Chen, J. L., Gao, S. J. (2019). Genetic diversity and population structure analysis of Saccharum and Erianthus genera using microsatellite (SSR) markers. Scientific reports, 9(1): 395.

Barba-González, R., Tapia-Campos, E., Lara-Bañuelos, T. Y., Cepeda-Cornejo, V., Dupre, P., Arratia-Ramirez, G. (2015). Interspecific Hybridization Advances in the Genus Eustoma. *Acta horticulturae*, (1097): 93-100.

Barba-González, R., Tapia-Campos, E., Lara-Bañuelos, T., Cepeda-Cornejo, V. (2017). Eustoma breeding, interspecific hybridization and cytogenetics. In *International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals 1167*: 197-204.

Barros, L. M., Prochnow, D., de Oliveira, V. F., da Silva, A. R., de Oliveira, A. C., da Maia, L. C. (2019). Characterization of Open-Pollinated Maize Varieties from Rio Grande do Sul State. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 22(1): 31-36.

Bernard, A., Barreneche, T., Lheureux, F., Dirlewanger, E. (2018). Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. *PloS one*, 13(11), e0208021.

Bugallo, V. L., Pannunzio, M. J., Facciuto, G. R. (2017). Análisis colorimétrico en flores de especies e híbridos de Passiflora= Colorimetric analysis in flowers of species and hybrids of Passiflora. *Horticultura argentina*, 36 (90): 5-12.

Carrillo, H. (2006). Evaluación de materiales genéticos del cultivo de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), bajo diferentes densidades de siembra, en condiciones ambientales controladas en la región de le tjer chimaltenango” Consejo nacional de ciencia y tecnología–CONACyT-secretaría nacional de ciencia y tecnología-SENACYT-fondo nacional de ciencia y tecnología-FONACYT-super pilon. SA.

Castillo-González, A. M., Avitia-García, E., Valdez-Aguilar, L. A., Velázquez-Maldonado, J. (2017). Extracción nutrimental en Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn) cv. Mariachi Pink. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2): 345-354.

Chen, Y., Feng, S., Zhao, T., Zhou, B. (2018). Overcoming obstacles to intergeneric hybridization between *Gossypium hirsutum* and *G.turneri*. *Euphytica*, 214(2): 35. doi.org/10.1007/s10681-018-2128-2.

Cheng, X., Chen, S., Chen, F., Deng, Y., Fang, W., Tang, F., Liu, Z., Shao, W. (2011). Creating novel chrysanthemum germplasm via interspecific hybridization and backcrossing. *Euphytica*, 177(1): 45-53. Doi: 10.1007/s10681-010-0248-2.

Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2): 169-196.

Cruz, C. E., Arévalo, G. L., Cano, M. R., Gaytán, A. E. (2006). Soluciones pulso en la calidad postcosecha de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) cv. 'echo blue'. *Agricultura técnica en México*, 32(2): 191-200.

De Carvalho Santos, T. T., de Oliveira Amorim, V. B., dos Santos-Serejo, J. A., da Silva Ledo, C. A., Haddad, F., Ferreira, C. F., Amorim, E. P. (2019). Genetic variability among autotetraploid populations of banana plants derived from wild diploids through chromosome doubling using SSR and molecular markers based on retrotransposons. *Molecular Breeding*, 39(7): 95.

De, L. (2017). Improvement of Ornamental Plants-A Review. *International Journal of Horticulture*, 7(22). Doi: 10.5376/ijh.2017.07.0022

De Souza, R. R., de Oliveira Paiva, P. D., da Silva, R. R., da Silva, D. P. C., dos Reis, M. V., Paiva, R. (2019). Morphogenetic potential of different sources of explants for efficient in vitro regeneration of *Genipa* sp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(1): 153-160.

Dotor-Robayo, M. Y., González Mendoza, L. A., Castro, M. A., Morillo-Coronado, A. C., Morillo-Coronado, Y. A. C. E. N. I. A. (2016). Análisis de la diversidad genética de la mora (*rubus* spp.) en el departamento de boyacá. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2): 10-17.

Historia de la Floricultura (2018). Consultado en 27 de febrero en <https://www.gob.mx/inaes/articulos/historia-de-lafloricultura?idiom=es>.

Huang, F., Wang, M., Zhiyong, L. (2017) Caucasian clover (*trifolium ambiguum* Bieb.) x White clover (*T. repens* L.) – Interspecific hybrids developed through tissue culture. *Lugume Research An International Journal*, 40(5): 830-385 doi: 10.18805/LR-317.

Iracheta, D., Peralta, M. C. L., Hernández, V. A. G., Cabrera, I. S., Soriano, E. C. (2003). Variación genotípica en la capacidad organogénica in vitro del maíz. *Agrociencia*, 37(5): 451-465.

Jain, S. M., Brar, D. S., Ahloowalia, B. S. (Eds.). (2010). *Molecular techniques in crop improvement* (p. 772). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. DOI 10.1007/978-90-481-2967-6_1

Kalle, E., Kubista, M., y Rensing, C. (2014). Reacción en cadena de la polimerasa multi-plantilla. *Detección y cuantificación biomolecular*, 2, 11-29.

Kaviani, B., Zamirae, F., Zanjani, S. B., Tarang, A., Torkashvand, A. M. (2014). In vitro flowering and micropropagation of *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) in response to plant growth regulators (NAA and BA). *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 13(4).

Khadivi, A., Montazeran, A., Rezaei, M., Ebrahimi, A. (2019). The pomological characterization of walnut (*Juglans regia* L.) to select the superior genotypes—An opportunity for genetic improvement. *Scientia horticultrae*, 248, 29-33.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. (2010) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*.

Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, 15

Mangosongo, H., Lyaruu, H., & Mneney, E. (2019). Agro-morphological Characterization of the Wild Rice (*Oryza longistaminata*) Populations From Selected Areas of Tanzania. *Tanzania Journal of Science*, 45(1): 9-17.

Naranjo, E. J., Fernandez Betin, O., Urrea Trujillo, A. I., Callejas Posada, R., & Atehortua Garces, L. (2016). Effect of genotype on the in vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* via somatic embryogenesis. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1): 87-98.

Pakoca, A. (2014). Bases para un programa de mejoramiento genético en *Alstroemeria*. Tesis. Instituto de Floricultura CIRN INTA.

Peakall, R. O. D., Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1): 288-295.

Piña-Escutia, J. L., Vences-Contreras, C., Gutiérrez-Martínez, M. G., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M. (2010). Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (Lf) DC. *Agrociencia*, 44(2): 147-158.

Ramírez Hernández, J. J., Avitia-Rodríguez, J. A. (2017). Floricultura mexicana en el siglo XXI: su desempeño en los mercados internacionales. Universidad Autónoma del Estado de México.

Raza, A., Mehmood, S. S., Ashraf, F., Khan, R. S. A. (2019). Genetic diversity analysis of Brassica species using PCR-based SSR markers. *Gesunde Pflanzen*, 71(1): 1-7.

Rodríguez, A. C., Díaz, M. G. C., Díaz, O. P. (2001). Comportamiento in vitro de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Análisis del potencial organogenético. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 253-259.

Rohlf, F.J. (2000), NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Exceter Software, New York, USA.

Santos, E. A., Souza, M. M., Abreu, P. P., Araújo, I. S., Viana, A. P., de Almeida, A. A. F., de Oliveira Freitas, J. C. (2012). Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica*, 184(3): 389-399.

Sathishkumar, R., Lakshmi, P. T. V., Annamalai, A., Arunachalam, V. (2011). Mining of simple sequence repeats in the Genome of Gentianaceae. *Pharmacognosy research*, 3(1): 19.

Shahid, A., Ayyub, C. M., Abbas, M., Ahmad, R. (2019). Assessment of genetic diversity in round gourd (*Praecitrullus fistulosus*) germplasm of Pakistan considering morphological characters. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(1): 215-224.

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2018), Consultado el 15 de Junio en <http://www.gob.mx/siap/>.

Sochor, M., Jemelková, M., y Doležalová, I. (2019). El fenotipado y los marcadores SSR como herramienta para la identificación de duplicados en el germoplasma de lechuga. *Revista checa de genética y fitomejoramiento*.

Suarez, L., Hernández, M., Téllez, G. (2013), Nuevo híbrido de *Dendrobium* (Orchidaceae) para cuba. *Cultivos tropicales*, (34)4: 49.

Takhtajan, A. (2009). *Flowering Plants* (2 ed.) San Petersburgo, Rusia: Springer. Doi: 10.1007/978-1-4020-9609-9.

Turner, B. L. (2014). Taxonomic overview of *Eustoma* (Gentianaceae). *Phytology*, 96(1): 7-11.

Uddin, A. J., Islam, M. S., Mehraj, H., Roni, M. Z. K., Shahrin, S. (2013). An evaluation of some Japanese lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) varieties grown in Bangladesh. *The Agriculturists*, 11(1): 56-60.

Uddin, A. J., Roni, M. Z. K., Islam, M. S., Ona, A. F., Sarker, M. S., Shimasaki, K. (2015). Study on growth, flowering and seed production of eight nandini (*Eustoma grandiflorum*) varieties. *International journal of business, social and scientific research*, 3(1): 25-29.

United Nations International Trade Statistics Database (UN COMTRADE) (2017), Consultado el 18 de Junio en <https://comtrade.un.org/>.

Vasconcelos, G. P. S. S., Do Rego, E. R., Cruz, M. S., Do Rego, M. M., Alves, E. U., Bruno, R. A. (2016). Effects of genotype and environment on in vitro seed germination and plantlet development of *Capsicum* spp. In *VII International Symposium on Seed, Transplant and Stand Establishment of Horticultural Crops-SEST2016 1204*: 243-248.

Venturieri, G. A., Nesi, B., Lazzereschi, S., Pecchioli, S., Burchi, G. (2017). Development of pollination and in vitro germination techniques to improve the hybridization in *Hydrangea* spp. *Advances in Horticultural Science*, 31(1): 45.