



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Coordinación de Estudios de Posgrado

Caracterización morfológica y molecular de genotipos de amarilis (*Hippeastrum* Herbert)

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta

Darcy Erandi Ramiro Alvarado

Bajo la supervisión del: **Juan Martínez Solís, Dr.**



APROBADA



Chapingo, Estado de México, noviembre 2022

**Caracterización morfológica y molecular de genotipos de amarilis (*Hippeastrum*
Herbert)**

Tesis realizada por Darcy Erandi Ramiro Alvarado bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 

Dr. Juan Martínez Solís

CO-DIRECTORA: 

Dra. Ma. de Jesús Juárez Hernández

ASESOR: 

Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

ASESOR: 

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| LISTA DE CUADROS..... | IV |
| LISTA DE FIGURAS..... | V |
| LISTA DE APÉNDICES..... | VI |
| AGRADECIMIENTOS..... | VII |
| DATOS BIOGRÁFICOS..... | VIII |
| RESUMEN..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| HIPÓTESIS..... | 3 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. Variabilidad genética..... | 4 |
| 2.2. Marcadores genéticos..... | 5 |
| 2.3. Marcadores moleculares..... | 6 |
| 2.4. Marcadores morfológicos..... | 9 |
| 2.5. Mejoramiento de ornamentales..... | 11 |
| 2.6. Generalidades de <i>Hippeastrum</i> | 12 |
| 2.7. Importancia económica de <i>Hippeastrum</i> | 14 |
| 2.8. Cultivares de <i>Hippeastrum</i> | 16 |
| 2.9. Estudios en <i>Hippeastrum</i> | 19 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 3.1 Caracterización molecular..... | 21 |
| 3.1.1 Extracción de ADN..... | 21 |
| 3.1.2 Cuantificación del ADN..... | 22 |
| 3.1.3 Pruebas de calidad..... | 22 |
| 3.1.4 PCR y electroforesis..... | 23 |
| 3.1.5 Análisis estadístico..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 3.2 Caracterización morfológica..... | 25 |
| 3.2.1 Material vegetal..... | 25 |
| 3. 2. 2 Descripción morfológica..... | 25 |
| 3. 2. 3 Determinación de colores..... | 27 |
| 3. 2. 4 Análisis estadístico..... | 27 |
| 3. 3 Análisis entre agrupamientos..... | 28 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 29 |
| 4.1 Caracterización molecular..... | 29 |
| 4. 1. 1 Cuantificación y pureza del ADN..... | 29 |
| 4. 1. 2 Descriptiva de los marcadores moleculares..... | 29 |
| 4. 1. 3. Análisis de agrupamiento..... | 34 |
| 4. 2 Caracterización morfológica..... | 37 |
| 4. 2. 1 Descripción de rasgos morfológicos..... | 37 |
| 4. 2. 2 Análisis de componentes principales..... | 39 |
| 4. 2. 3 Análisis de agrupamiento y discriminante..... | 41 |
| 4. 2. 4 Descripción de grupos..... | 43 |
| 4. 3 Cruzamiento entre grupos..... | 48 |
| V. CONCLUSIONES..... | 54 |
| VI. LITERATURA CITADA..... | 55 |
| APÉNDICE..... | 63 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Valores de pureza de ADN a partir de la relación entre absorbancia de 280-260 nm..... | 23 |
| Cuadro 2. Temperatura de alineamiento y secuencia de los iniciadores ISSR..... | 25 |
| Cuadro 3. Lista de los descriptores evaluados en 64 accesiones de amarilis..... | 27 |
| Cuadro 4. Descriptiva de los 23 iniciadores ISSR utilizados para caracterizar 64 accesiones de amarilis..... | 32 |
| Cuadro 5. Media, desviación estándar, valor máximo y mínimo obtenido de doce rasgos morfológicos cuantitativos evaluados en las 64 accesiones.. | 40 |
| Cuadro 6. Comparación de medias por rasgo entre los tres grupos identificados a través del análisis de agrupamiento..... | 47 |
| Cuadro 7. Organización de las accesiones de amarilis, resultado del cruzamiento entre los dendrogramas obtenidos de la caracterización molecular y morfológica..... | 50 |
| Cuadro 8. Comparación de medias de diez rasgos cuantitativos entre los grupos formados del cruzamiento de dendrogramas de accesiones de amarilis..... | 53 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Dendrograma construido a partir de la distancia de Jaccard y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward..... | 36 |
| Figura 2. Dendrograma de accesiones de amarilis construido a partir de la distancia de Gower y el método de agrupamiento de la varianza mínima de Ward..... | 43 |

LISTA DE APÉNDICES

| | |
|---|-----------|
| Apéndice 1a. Acciones que integran al grupo I*I | 63 |
| Apéndice 1b. Acciones que integran al grupo I*II | 64 |
| Apéndice 1c. Acciones que integran al grupo I*III | 64 |
| Apéndice 1d. Acciones que integran al grupo II*I | 65 |
| Apéndice 1e. Acciones que integran al grupo II*II | 65 |
| Apéndice 1f. Acciones que integran al grupo II*III | 65 |
| Apéndice 1g. Acciones que integran al grupo III*I | 66 |

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por darme el financiamiento para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por aceptarme como parte de la comunidad estudiantil y permitirme seguir con mi formación profesional.

A mi director, el doctor Juan Martínez Solís, por ayudarme, por sus revisiones a este trabajo y por dirigirlo.

A mi codirectora, la doctora Ma. de Jesús Juárez Hernández por brindar el material, objeto de estudio en este trabajo y por su apoyo.

A la doctora Margarita Gisela Peña Ortega por sus correcciones y revisión a este trabajo y por permitirme ser parte del laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido.

Al doctor Oscar Mascorro Gallardo por sus observaciones y revisión a este trabajo.

Al técnico del laboratorio, Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández, por su asesoría, paciencia y recomendaciones en la realización experimental de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Héctor y Plácido, por asesorarme y aconsejarme en el análisis de datos.

A mis profesores del posgrado por enseñarme una nueva visión profesional.

A mi familia, por escucharme, aconsejarme, por su paciencia, su afecto y estar siempre conmigo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos.

Nombre: Darcy Erandi Ramiro Alvarado

Fecha de nacimiento: 14 de febrero de 1997.

Profesión: Licenciada en biología.

Cédula profesional: 12212309



Desarrollo académico.

Bachillerato 2011-2014 Bachillerato General Próceres de la Sierra.

Licenciatura 2014-2019 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Maestría 2021-2022 Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN

Caracterización morfológica y molecular de genotipos de amarilis (*Hippeastrum Herbert*)¹

Las plantas ornamentales de *Hippeastrum*, apreciadas por la estética de sus flores, son objetivo de programas de mejoramiento que buscan modificar su apariencia y calidad. Estos programas parten de conocer y describir la variabilidad genética de accesiones molecular y morfológicamente. Los marcadores moleculares ISSR son reproducibles, polimórficos y neutrales; mientras que los descriptores morfológicos evalúan rasgos fenotípicos, la variabilidad observable y la calidad del material. En este estudio se caracterizaron 64 accesiones de *Hippeastrum* con el objetivo de conocer su variabilidad genética, utilizando 23 iniciadores ISSR y 39 descriptores morfológicos. Se obtuvieron 167 bandas con 88.02 % de polimorfismo y un promedio de 7 bandas por iniciador. Los iniciadores con más bandas polimórficas fueron ISSR1, ISSR3 e ISSR6 con valores de PIC de 0.35, 0.28 y 0.27, respectivamente. Las distancias de Jaccard oscilaron entre 0.30-0.81, y el agrupamiento por varianza mínima de Ward permitió identificar tres grupos con tendencia a asociarse por el ancho de la flor. Con los descriptores morfológicos se realizó un análisis de componentes principales (CPs), identificándose cinco CPs que explicaron el 70 % de la variabilidad total. Las distancias de Gower y el método de Ward produjeron asimismo tres grupos, donde doce características cuantitativas mostraron ser altamente discriminantes para definir la agrupación explicando el 72 % de la variabilidad. Entre accesiones y grupos, los rasgos fueron estadísticamente diferentes donde los grupos se separaron entre sí por sus colores principales y patrones de distribución en la flor. El análisis de cruzamiento entre dendogramas tuvo una coincidencia del 46 %, sugiriendo la complementación de ambas caracterizaciones para seleccionar genotipos y planear y diseñar programas de mejoramiento.

Palabras clave: ISSR, descriptor morfológico, análisis de agrupamiento, variabilidad genética.

¹Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autora: Biol. Darcy Erandi Ramiro Alvarado
Director de Tesis: Dr. Juan Martínez Solís

ABSTRACT

Morphological and molecular characterization of amaryllis (*Hippeastrum* Herbert)

genotypes ²

***Hippeastrum* ornamental plants, valued for floral aesthetics, are the target of breeding programs that seek to modify their appearance and quality. These programs are based on the knowledge and description of the genetic variability of accessions through a molecular and morphological approach. ISSR molecular markers are reproducible, polymorphic, and neutral; meanwhile, morphological descriptors assess phenotypic traits to determine the observable variability and material quality. In this research study, 64 *Hippeastrum* accessions were characterized to explore their genetic variability using 23 ISSR primers and 39 morphological descriptors. 167 bands were obtained, 88.02 % were polymorphic with an average of 7 bands per primer. Primers ISSR1, ISSR3 and ISSR6 showed PIC values of 0.35, 0.28 and 0.27, respectively. Jaccard distances ranged from 0.30-0.81 and according to the Ward's method three groups were identified with a tendency to associate with flower width Principal component analysis was carried out on morphological descriptors, where five principal components explained 70 % of the total variability. Clustering analysis based on Gower distances and Ward's method resulted in three groups, where 12 quantitative traits evaluated showed to be highly discriminant to explain 72 % of the total variability. Quantitative traits were statistically different among accessions and groups; formed groups differed by main color and color distribution patterns in the flowers. Crossed analysis between dendrograms showed 46 % coincidence suggesting the need for complementation of both characterizations for the selection of accessions when planning and designing breeding programs.**

Keywords: ISSR, morphological descriptor, clustering analysis, genetic variability.

²Thesis of Horticultural Sciences MSc program, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Biol. Darcy Erandi Ramiro Alvarado
Advisor: Dr. Juan Martínez Solís

I. INTRODUCCIÓN

La floricultura es una actividad comercial dedicada al cultivo y multiplicación de plantas con flor y follaje para fines ornamentales. En México estos productos ocupan el cuarto lugar de exportación y tercero de producción, ya sea como flores de corte, plantas de maceta o bulbos (Ramírez-Hernández & Avitia-Rodríguez, 2017; SAGARPA, 2020). En el mercado, los productos florales son buscados por su belleza estética y calidad como apariencia fresca, color y limpieza de los pétalos, grosor, rigidez y altura del tallo (Tejeda-Sartorius, Ríos-Barreto, Trejo-Téllez & Vaquera-Huerta, 2015).

En México se producen varias especies en una superficie próxima a 20,000 hectáreas, destacando el Estado de México, Veracruz y Puebla con un consumo interno cercano a 1000 millones de dólares anuales (Ramírez-Hernández & Avitia-Rodríguez, 2017; SIAP, 2019).

El género neotropical *Hippeastrum* de los más diversos de la familia Amaryllidaceae, incluye cerca de 94 especies (WFO, 2022) y económicamente tiene relevancia pues la mayoría de sus especies han sido empleadas con propósitos ornamentales y sus flores comprenden una amplia variedad de colores que por su longevidad es comercializada como flor de corte y en maceta (Merrow, 2009). Asimismo, tépalos grandes de tonalidades brillantes, varias flores por inflorescencia, floración prolongada y pedicelos largos son algunas características más demandados en el mercado y por ello son el objetivo de iniciativas de mejoramiento (Meerow, 2009; Wang et al., 2018; Azimi & Alavijeh, 2020). Durante cerca de 200 años, desde que se tiene registro del primer cultivar creado *Hippeastrum* x 'Johnsonii'; se han registrado más de 600 cultivares comercializados en todo el mundo, resultado de la selección de accesiones y programas de mejoramiento (Merrow, 2009; Merrow, 2014).

Un parámetro importante en los programas de mejoramiento es la variabilidad genética de los cultivares, frecuentemente evaluada a través de su caracterización molecular con marcadores (Xiong et al., 2020) que son herramientas útiles en la identificación y registro de cultivares para su posterior venta (Chakrabarty, Gupta & Datta, 2007). Por

ello, desde hace años la estrategia en los programas de mejoramiento se basa en conocer la variabilidad genética de accesiones aplicando técnicas moleculares de ADN, analizar sus relaciones genéticas, filogenia, polimorfismos e identificar genes involucrados en la expresión de ciertas características de interés (Wang et al., 2018; Xiong et al., 2020). En *Hippeastrum* se han usado técnicas basadas en PCR para analizar el ADN, como RAPD (Chakrabarty et al., 2007; Nguyễn et al., 2014; Phuong, Isshiki & Miyajima, 2014), SSR (Wang et al., 2018), SRAP (Xiong et al., 2020) e ISSR (Zhang et al., 2012).

La caracterización molecular suele ser complementada con la caracterización morfológica, ya que identificar las características morfológicas y evaluar la calidad de las accesiones, es el primer criterio de selección del material deseado, siendo otra forma de explorar la variabilidad genética (Aneja, Yadav, Chawla & Yadav, 2012; Nascimento et al., 2013; Merrow, 2014; Azimi & Alavijeh, 2020). Esa variación morfológica ha permitido la obtención de las variedades existentes y la identificación de características deseables (Merrow, 2009).

Los rasgos morfológicos para evaluar pueden definirse según la demanda en el mercado y por las características propias de los cultivares o especies botánicas (Tombolato, Dutilh, Barbosa, Veiga & Lucon, 2007). Las directrices de la UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) para amarilis (*Hippeastrum* Herb.) son una herramienta útil, aunque su objetivo es establecer alternativas para evaluar la uniformidad, distinción y estabilidad de variedades (UPOV, 2001), incluyen características de las nuevas variedades que se han registrado, además de estar muy relacionadas con su demanda en el mercado, por lo que frecuentemente son usadas al caracterizar morfológicamente genotipos de *Hippeastrum* (Tombolato et al., 2007; Nascimento et al., 2013; Azimi & Alavijeh, 2020).

Este panorama sobre la popularidad y el potencial de los genotipos de *Hippeastrum*, hacen evidente la importancia de caracterizar morfológica y molecularmente accesiones con el fin de obtener recursos genéticos útiles para la planeación de futuros programas de mejoramiento por lo cual se plantea el presente estudio con los siguientes objetivos

OBJETIVOS

General

Caracterizar morfológica y molecularmente 64 accesiones de *Hippeastrum* para observar la variabilidad genética con fines de mejoramiento genético.

Particulares

Caracterizar morfológicamente accesiones de *Hippeastrum* con base en los descriptores de la UPOV.

Estandarizar un protocolo en esta especie para extracción y amplificación de ADN empleando iniciadores ISSR.

Evaluar la variabilidad genética de *Hippeastrum* con marcadores moleculares ISSR.

HIPÓTESIS

Los iniciadores ISSR y los descriptores morfológicos permitirán observar el polimorfismo y conocer la variabilidad de las accesiones evaluadas. Después de complementar los análisis molecular y morfológico se podrá tener información útil para un programa de mejoramiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Variabilidad genética

La variabilidad genética es producto de mutaciones que ocurren como cambios aleatorios en el ADN y de las recombinaciones del material genético tras la fertilización; se reconocen como fuente de variabilidad los eventos evolutivos (adaptación, selección natural, etc.), presiones causadas por el hombre al seleccionar artificialmente los recursos y domesticarlos y la exposición a ciertos agentes externos mutagénicos (Franco & Hidalgo, 2003).

Desde una visión agronómica enfocada al mejoramiento de cultivos, la variabilidad genética representa solo una porción de la diversidad genética de las poblaciones de las especies, contenida en las accesiones que integran la colección, información genética clave para los programas de mejoramiento, pues es la información disponible para seleccionar (Franco & Hidalgo, 2003; Loo, 2011).

La variabilidad contenida en el genoma puede expresarse en los rasgos fenotípicos, pudiendo ser caracterizada con descriptores morfológicos, que particularmente en ornamentales es indispensable evaluarlos durante la floración; o no ser perceptibles fenotípicamente y ser solo detectables por medio de herramientas moleculares que analicen proteínas o el ADN (Hennipman, 1999; Villareal, 2013).

En los programas de mejoramiento, la variabilidad genética de las colecciones se elimina o reutiliza durante la selección de las características deseables a permanecer en los genotipos; en consecuencia, las colecciones con mucha variabilidad tienen más probabilidad de éxito (Wang et al., 2018). Además, analizar la variabilidad genética, morfológica y molecularmente, brinda información complementaria y útil en la selección del material (Franco & Hidalgo, 2003).

La caracterización de las accesiones permite conocer el tipo de material que integra las colecciones. Analizando parámetros agronómicos o información molecular, pueden obtenerse distancias que comparan entre pares a los genotipos y reflejan que tan variable es el material evaluado por medio de la similitud y disimilitud (Franco &

Hidalgo, 2003; Wang et al., 2018). Conocer la similitud (o disimilitud) entre las accesiones a incorporar en un programa de mejoramiento facilita su organización y selección, pero particularmente incrementa su utilidad integrando tanto datos morfológicos como moleculares (Caruso, Broglia & Pocovi, 2018).

2.2. Marcadores genéticos

El hombre ha domesticado y mejorado genéticamente recursos fitogenéticos, optimizando su valor agronómico y ornamental en beneficio propio; para ello, ha sido necesario conocer el material vegetal, haciéndolo desde un enfoque morfológico, bioquímico y molecular (Swarup et al., 2021).

Los marcadores que permiten dichos estudios son secuencias de ADN, características morfológicas o moléculas identificables que pueden asociarse a un locus determinado y son distintivos entre las accesiones o eso se espera; estas pertenecen a una de las siguientes clases: marcadores morfológicos, moleculares o bioquímicos (Becerra & Paredes, 2000; Nadeem et al., 2018).

Las proteínas de reserva e isoenzimas son marcadores bioquímicos, resultado de la expresión de diferentes genes entre individuos o poblaciones, las biomoléculas tienen diferente peso y carga, por lo que se separan en varias bandas y así permiten el análisis de variación genética (Masuelli, 1999). Los marcadores morfológicos se basan principalmente en variaciones fenotípicas, es decir, aquellas que son observables; mientras que los moleculares, se enfocan más en la evaluación del ADN (Franco & Hidalgo, 2003). El uso de marcadores moleculares suele complementarse con descriptores morfológicos que son abundantes y evalúan características de interés ornamental (Aneja, Yadav, Chawla & Yadav, 2012).

Independientemente de su naturaleza, se espera que los marcadores sean altamente polimórficos, pues son los más informativos, de lo contrario, los monomórficos poco ayudan a la diferenciación del material (Loo, 2011).

Los marcadores genéticos frecuentemente son usados como herramientas de selección y caracterización de accesiones; la caracterización es una herramienta que permite

conocer la variabilidad genética y su eficacia varía según los objetivos de la investigación, las características de la unidad experimental y las cualidades de los marcadores (Masuelli, 1999; Loo, 2011; Colin, 2014).

La caracterización puede identificar taxonómicamente al material, clasificarlo sistemáticamente, resolver aspectos evolutivos o filogenéticos, conocer la estructura genética de cierta población o poblaciones, medir la variabilidad genética de accesiones que conforman una colección, preclasificar genotipos, identificar alelos, entre otros más (Colin, 2014; Franco & Hidalgo, 2003).

2.3. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se basan en la identificación de diferencias en las secuencias de nucleótidos, es decir, la detección de polimorfismos en el ADN y en la actualidad son frecuentemente usados como herramientas de evaluación en el fitomejoramiento (Widrechner, 2010; Nadeem et al., 2018).

La información obtenida con marcadores moleculares puede ser usada en estudios filogenéticos y evolutivos empleando ADN de cloroplastos, de mitocondrias o nuclear, identificar transgénicos y plantas somaclonales en cultivos *in vitro*, detectar material duplicado en colectas, determinar similitudes genéticas y el nivel polimórfico entre accesiones, caracterizar germoplasma de reciente adquisición, aislar y clonar genes, selección asistida por marcadores, entre otras más útiles aplicaciones (Masuelli, 1999; Widrechner, 2010; Nadeem et al., 2018).

En la caracterización molecular los marcadores permiten identificar las accesiones y determinar sus relaciones genéticas, con ellos la identidad de las accesiones es reflejada por patrones de banda, útil para estimar su variabilidad genética y determinar la efectividad de los marcadores (Laurentin, 2009).

Algunas ventajas de estas técnicas es que los polimorfismos identificados en el ADN generan marcadores con variaciones elevadas, son neutrales, detectan mutaciones y los análisis pueden hacerse a partir del genoma nuclear, mitocondrial o del cloroplasto (Widrechner, 2010). Además, en general pueden evaluarse muestras pequeñas de

ADN de cualquier estructura vegetal, no suele afectar la etapa de desarrollo de la planta y bajo condiciones adecuadas puede almacenarse el ADN o las muestras vegetales para su análisis (Aneja et al., 2012).

Algunos marcadores se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proceso que reproduce *in vitro* la amplificación de secuencias específicas de ADN, generalmente indicadas por los iniciadores; lo cual ocurre a través de ciclos térmicos que generan las condiciones óptimas para la desnaturalización del ADN, su alineamiento con los iniciadores y su extensión (Loo, 2011; Nadeem et al., 2018). Otra técnica que suele acompañar a la PCR es la electroforesis que a través de una corriente eléctrica separa en diferentes distancias las moléculas de ADN según su carga, tamaño o peso, generando patrones de banda que deben ser descritos (Loo, 2011).

Las características preferidas en los iniciadores son: fácil detección de polimorfismo, reproducibles, alta capacidad discriminante, de distribución uniforme en el genoma y bajo costo, pues este último suele ser otro factor influyente en la decisión de cual técnica emplear; estas cualidades en los marcadores permiten la aceleración del desarrollo de programas de mejoramiento, al conocerse la huella genética de los genotipos y su variabilidad (Staub & Serquen, 1996; Mondini, Noorani & Pagnotta, 2009; Nadeem et al., 2018).

Los marcadores moleculares son comúnmente empleados en programas de mejoramiento para evaluar las relaciones genéticas y la variabilidad; información que se usa para seleccionar el material que integrará las colecciones, pues selecciones tempranas vuelven más eficiente el trabajo (De Riek, & Debener, 2009). Los marcadores basados en PCR que han sido empleados en estudios de *Hippeastrum* son los SSR (Wang et al., 2018), RAPD (Chakrabarty, Gupta & Datta, 2007; Hoa et al., 2014; Phuong, Isshiki & Miyajima, 2014), ISSR (Zhang, 2012) y SRAP (Xiong et al., 2020; Xiong et al., 2021).

SSR (Simple sequences repeats)

Los iniciadores son un par de secuencias específicas pequeñas de 1-5 nucleótidos que reconocen secuencias cortas altamente variables, esparcidas y repetidas en muchos sitios del genoma; debido a su abundancia y variación entre accesiones generan alto polimorfismo (Loo, 2011). Son multialélicos, robustos, reproducibles y codominantes, permitiendo diferenciar entre homocigotos y heterocigotos. El polimorfismo se debe al diferente número de secuencias repetidas. Sin embargo, requieren el diseño específico de los iniciadores, conocer previamente la secuencia del ADN de interés y equipos más sensibles (Widrechner, 2010).

RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Solo un iniciador aleatorio se emplea en esta técnica, con una extensión de 10 pb que debe contener más del 60 % de bases GC (Loo, 2011). La amplificación ocurre cuando secuencias en el ADN complementarias al iniciador se encuentran en orientación opuesta y en una longitud cercana a 2000 pares de bases. Son marcadores dominantes que suelen ser medianamente polimórficos, los polimorfismos ocurren por variaciones en las secuencias entre los sitios de unión (Staub & Serquen, 1996). Algunas de sus ventajas son la poca cantidad de ADN requerido de 10-25 ng y su bajo costo, pero los resultados tienen baja repetibilidad y pueden variar entre laboratorios (Alcántara, 2007).

ISSR (Inter-simple sequence repeats):

Son marcadores que detectan solo un alelo por locus, por lo que son dominantes y la presencia de bandas no diferencia entre homocigotos dominantes o heterocigotos, mientras que la ausencia de esta se interpreta como homocigoto recesivo. El polimorfismo entre accesiones lo define la presencia y ausencia de bandas (Alcántara, 2007; Nadeem et al., 2018). Su estructura principalmente se basa en repeticiones de dinucleótidos o trinucleótidos que deben complementar con la secuencia de ADN. Suelen sumarse nucleótidos extras en los extremos que aseguran que la amplificación inicie en el extremo 5' o 3' (Alcántara, 2007). Contrario a los RAPD brindan mayor reproducibilidad y especificidad, debido a que se emplean dos iniciadores de 16-25 pb de longitud y temperaturas de alineamiento más elevadas (Pradeep, Sarla & Siddiq,

2002). Se amplifican segmentos de ADN limitados por los dos iniciadores idénticos orientados en dirección opuesta, permitiendo obtener fragmentos de 100-2000 pb (Ng & Tan, 2015).

SRAP (sequence-related amplified polymorphism)

Son marcadores dominantes de reciente creación reproducibles y altamente polimórficos; se requieren dos iniciadores de 17-18 nucleótidos, en general, su secuencia se caracteriza por presentar en el extremo 5' entre 10 a 11 bases sin un orden determinado delimitados en frente con la secuencia CCGG- o atrás con -AATT, seguido de 3 bases precisas en el extremo 3' (Robarts & Wolfe, 2014; Nadeem et al., 2018). Son útiles para demostrar variación en distintos niveles taxonómicos y entre variedades, al igual que los demás marcadores dominantes no suelen diferenciar entre homocigotos dominante y heterocigoto (Aneja et al., 2012).

La elección del marcador a emplear depende de las características del material, los objetivos de la investigación, la cantidad de ADN disponible, los costos, el conocimiento de la técnica y el equipo que requiere; pues siendo marcadores basados en PCR, las opciones son numerosas (Staub & Serquen, 1996).

2.4. Marcadores morfológicos

Se trata de descriptores que permiten expresar el estado del atributo fenotípico de las accesiones, determinar la variabilidad observable entre ellas y diferenciarlas entre sí (Hernández, 2013). Cuando se emplean en la agronomía, suelen denominarse morfoagronómicos, pues no tienen un enfoque botánico o taxonómico, sino uno dirigido al mejoramiento de cualidades agronómicas, a la demanda y al consumo en el mercado (Franco & Hidalgo, 2003).

Antes del desarrollo de los marcadores moleculares, los fitomejoradores y taxónomos principalmente empleaban los descriptores morfológicos para caracterizar los genotipos o ejemplares taxonómicos de estudio, especialmente en los programas de mejoramiento, esto se volvía una desventaja al extenderse los tiempos en la selección de características de interés (Widrechner, 2010).

Debido a la influencia que puede generar el ambiente sobre la expresión de ciertas características, es recomendable emplear descriptores que en análisis previos se haya determinado evalúan rasgos altamente heredables y sobre todo de detección y variación fácilmente observable (Franco & Hidalgo, 2003; Widrlechner, 2010). Es importante no dejar de lado la cualidad polimórfica en algunas características que se examinan, pues mientras más polimórficos sean, incrementa su utilidad en la identificación y clasificación del material; sin embargo, esa variación debe ser propia, discriminante y representativa del grupo de interés y no debe ser compartida por otros genotipos que no pertenezcan al cultivar (Widrlechner, 2010).

Por la naturaleza de los descriptores, pueden ser cuantitativos o cualitativos y debido a que en la mayoría de las ocasiones las características a evaluar no se manifiestan en la misma intensidad, los descriptores suelen dividirse en distintas categorías o escalas que se denominan estado del descriptor (Hernández, 2013).

La caracterización morfológica permite el estudio de su variabilidad genética, y al analizarse rasgos de relevancia agronómica, suelen emplearse descriptores morfológicos de fácil evaluación y con capacidad de discriminar entre fenotipos (Franco & Hidalgo, 2003; Hernández, 2013). En ornamentales, la evaluación morfológica es indispensable, ya que el principal atractivo son los rasgos fenotípicos de la flor y con base a ellos se selecciona el material (Merrow, 2009), por lo que, la caracterización morfológica es un paso esencial en los programas de mejoramiento al permitir monitorear la calidad genética, seleccionando así los mejores genotipos para ser utilizados en los programas de mejoramiento (Azimi, Jozghasemi & Barba-Gonzalez, 2018).

Dependiendo del cultivar, hay diferentes directrices que brindan los descriptores para caracterizar el material; algunas publicadas por la UPOV que ofrece 337 directrices enfocadas en la descripción de variedades o el IPGRI que en colaboración con la FAO presentan descriptores para más de 100 especies cultivadas (Franco & Hidalgo, 2003; UPOV, 2001; UPOV, 2021). Algunos descriptores son más adecuados para determinado cultivar al incluir rasgos de las nuevas variedades comercializadas y los deseables en el

mismo (Franco & Hidalgo, 2003; Tombolato et al., 2007). Las directrices de la UPOV brindan descriptores para accesiones de *Hippeastrum*, más de 30 descriptores cualitativos, pseudocualitativos y cuantitativos evalúan principalmente atributos florales, algunos de hojas y escapos florales, pues en el mejoramiento de *Hippeastrum* en dichas estructuras buscan fijarse las variaciones fenotípicas (Merrow, 2009).

2.5. Mejoramiento de ornamentales

Swarup et al. (2021) indicaron que “el fitomejoramiento es el proceso de utilizar la diversidad y variabilidad genética para cambiar la composición genética de las plantas y producir rasgos fenotípicos preferidos”.

En las plantas ornamentales se busca hacer estéticamente más atractivos los productos florales. Para ello la variabilidad genética se aprovecha en la selección de las características deseables y en la posterior incorporación eficaz de la información genética de interés (Tombolato & Matthes, 1996; Swarup et al., 2021).

En este contexto, en el fitomejoramiento es requisito integrar colecciones vivas de recursos fitogenéticos y caracterizar los genotipos de reciente adquisición para generar un acervo genético útil para futuros proyectos (Hennipman, 1999), planear adecuadamente los programas de mejoramiento y dirigirlos a la obtención de características florales deseables y a la producción de cultivares (Tombolato & Matthes, 1996; Meerow, 2014).

Las colecciones son las fuentes potenciales de esta información genética; pueden estar integradas por cultivares desarrollados, variedades, razas o especies silvestres; generalmente suelen seleccionarse materiales genéticamente próximos o se incorpora material con mutaciones inducidas, mutaciones espontáneas o características especiales con potencial de otorgar mayor valor ornamental (Doré & Varoquaux, 2006; Swarup et al., 2021).

La cruce entre las accesiones seleccionadas ha sido una práctica clave para generar variabilidad genética, concentrar los genes o combinar aquellos favorables e incorporarlos a la descendencia; en las plantas ornamentales es el origen de las complejas formas y colores de hojas, flores o frutos (Kamenetsky & Okubo, 2012).

La creación de nuevos genotipos es el origen de nuevas variaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas. Y estando enfocados a los intereses y necesidades de consumidores y el mercado, se desarrollan cultivares muy diferentes; los cuales, además de cumplir con las demandas de los compradores, con un adecuado manejo, funcionan como acervo genético, aumentando la variabilidad genética útil para futuros proyectos de mejoramiento (Doré & Varoquaux, 2006; Swarup et al., 2021).

Por los eventos ocurridos durante el fitomejoramiento se identifican algunas etapas: la inicial que es la identificación de rasgos de interés en las accesiones que integran las colecciones a través de su caracterización; posteriormente, se promueven recombinaciones genéticas por el cruzamiento entre el material seleccionado y finalmente tras varios años de cruzar las poblaciones y evaluar el material, se generan líneas de descendencia y se seleccionan aquellos genotipos que presenten los rasgos de interés y se descartan las que no (Swarup et al., 2021).

Esos programas son trabajos multidisciplinarios de larga duración y al final los materiales vegetales iniciales suelen ser muy distintos a los nuevos genotipos (Tombolato & Matthes, 1996). Aunque recientemente se están empleando nuevas técnicas de mejoramiento y herramientas genómicas que han optimizado la manera de incorporar la información genética de interés en los cultivares, en general se siguen manteniendo las restricciones de tiempo y recursos (Datta, 2021; Swarup et al., 2021).

2.6. Generalidades de *Hippeastrum*

La familia Amaryllidaceae está conformada por aproximadamente 70 géneros, la mayoría son plantas con bulbos que por varias décadas han sido cultivados como ornamentales. El género *Hippeastrum* forma parte de esta familia botánica y contiene 94 especies ornamentales de flor (WFO, 2022). La mayoría de las especies que la integran se distribuyen en América, países como Chile, Brasil, Bolivia, Argentina, alcanzando varios estados de México (Meerow, 2009).

Son plantas perennes con bulbos carnosos, alargados y tunicados que producen entre tres y seis hojas basales brillosas y lineares glabras que llegan a superar los 30 cm de longitud.

Las flores se desarrollan terminalmente en escapos huecos y rígidos, cuyas dimensiones varían entre los 30-80 cm dependiendo del cultivar o la especie; producen de 1 a 2 inflorescencias cada planta, siendo dos cuando los bulbos son de gran tamaño (Fishchuk, 2021). Las flores se unen a los escapos florales a través de los pedicelos, cuyas dimensiones difieren entre cultivares, con menos de 1 cm hasta superar los 5 cm (Büneker & Bastianabral, 2017).

Las inflorescencias umbeliformes tienen de 2-6 flores (en su mayoría son 4); el androceo está formado por 6 estambres libres con filamentos largos y delgados, mientras que el gineceo se forma por un estigma trífido cuyas dimensiones suelen ser muy variables. Las flores son zigomorfas, hermafroditas de porte horizontal o inclinado (Meerow & Snijman, 1998; Büneker & Bastianabral, 2017).

Las flores simples tienen seis tépalos subiguales dispuestos en dos series y las compuestas más de 6 en varias series; los tépalos son libres, solo fusionados en la base, formando un pequeño tubo. Se dividen en tépalos externos, medios internos e inferiores internos, difiriendo entre sí por su forma y tamaño principalmente (Fishchuk, 2021).

El rango de colores del perianto es muy amplio, aunque suelen identificarse algunos grupos principales blanco, blanco con rubores rojos o rosas, amarillo, salmón, rosa claro, rosa, naranja, rojo y rojo oscuro, en diferentes patrones y combinación de tonalidades. Siendo el blanco y el rojo los colores más comunes (Fishchuk, 2021; UPOV, 2001; UPOV, 2021).

Su floración inicia a mediados de febrero, terminando a finales de abril y principios de mayo (Datta, 2021).

En cuanto a su propagación, puede hacerse a través de semillas, bulbos, esquejes basales, escamas y propagación *in vitro* (Datta, 2021). En el caso de los bulbos, el

crecimiento óptimo ocurre en temperaturas cálidas (20 °C a 25 °C) durante 9-10 meses; durante los cuales ocurre el crecimiento vegetativo y posteriormente la floración; en temperaturas inferiores hay floración prematura, contaminación por hongos y se detiene su crecimiento (Doorduyn & Verkerke, 2002).

El fruto es una cápsula con tres lóculos, contienen semillas alargadas, negras y con una membrana delgada que en estado silvestre facilita su dispersión. Cuando estas se emplean para propagar, tardan entre 2 a 5 años en presentar un desarrollo vegetativo (Fishchuk, 2021).

Se adaptan adecuadamente tanto a climas cálido como húmedos, características que les otorgan un elevado potencial económico y permite su comercialización en varios países, desde América, Asia, Europa y África (Wang et al., 2018).

2.7. Importancia económica de *Hippeastrum*

En México la floricultura destaca como actividad económica por la demanda de sus productos florales tanto en el mercado nacional como internacional. Se han reportado producciones anuales superiores a 8 millones de gruesas (144 unidades) de rosas; más de 11 millones de gruesas de crisantemo; más de 1 millón de gerberas y orquídeas; 361 mil gruesas de girasol y cerca de 187 mil plantas de tulipanes (SAGARPA, 2018; SAGARPA, 2020).

Por otro lado, los estados cuyas producciones destacan son el Estado de México con la venta de rosas y gerberas, la Ciudad de México con el tulipán y Jalisco con las orquídeas (SAGARPA, 2018).

De modo que en el país las mayores ventas corresponden a las rosas, claveles, gladiolas, dalias, crisantemos, nochebuenas, tulipanes y en menor volumen al alhelí, aretillo, flor perrito, margarita, orquídeas, flores de bulbo en las que se incluyen a *Hippeastrum* y lilis, entre otras (SIAP, 2020).

Mostrando que, a pesar de su gran potencial económico, los productores en México poco valoran los productos florales de *Hippeastrum*. Asimismo, se han inscrito

variedades de cempoalxóchitl (tagetes), cosmos, crisantemo, dalia, estrella de coral, gerbera, tigridia, rosa, noche buena y lirio azteca en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, pero no se cuenta con ningún registro de *Hippeastrum* (SNICS, 2022). Probando nuevamente que no se ha integrado en programas de mejoramiento; en consecuencia, el reducido número de accesiones que se venden en México es material proveniente de otros países y al final solo se multiplican los bulbos.

Por el contrario, los mercados y productores extranjeros dan mayor relevancia a este recurso ornamental. Los principales mercados y centros de mejoramiento de *Hippeastrum*, con más cultivares registrados y altos ingresos económicos por su comercialización, se ubican en Sudáfrica y Países Bajos; habiendo otros en Japón, India, Israel, Costa Rica y recientemente iniciando con programas de mejoramiento Brasil y Chile (Meerow, 2014). Siendo el líder Países Bajos, sobresale tanto la venta de bulbos como flores de corte, reportándose en 2004, 185 hectáreas dedicadas únicamente al cultivo de *Hippeastrum* (CBI, 2016).

Los consumidores generalmente emplean las accesiones como decoración y paisajismo en jardines, bardas, parques, hogares y eventos sociales o religiosos; sembradas en camas, macetas o como flores de corte; siendo apreciadas por el gran tamaño de sus flores y colores llamativos (Datta, 2021). Los bulbos de *Hippeastrum* son los productos de mayor consumo en el mercado internacional de flores en comparación con las flores de corte (Tombolato et al., 2007).

Por otro lado, debido a la importancia de *Hippeastrum* en la floricultura, a lo largo de las décadas se han desarrollado numerosas investigaciones con el objetivo de optimizar la producción, la calidad del cultivar y la obtención de nuevo material genético. Existen reportes de diferentes países acerca de su propagación *in vitro* con el objetivo de producirlas masivamente y optimizar sus ventas (Seabrook & Cumming, 1977; Jamil et al., 2014), sobre enfermedades del cultivo (Raj et al., 2009; Liang et al., 2018), nutrición (Silberbush et al., 2003; Inkham, Panjama & Ruamrungsri, 2022), concentración de antocianinas en periantos de distintos colores (Byamukama et al., 2006), sobre su fitoquímica por su alto contenido de alcaloides y su potencial aplicación en la medicina

(Al Shammari et al., 2021), aquellas dirigidas a la obtención de información morfológica y molecular (Chakrabarty, Gupta & Datta, 2007; Zhang, 2012; Hoa et al., 2014; Phuong, Isshiki & Miyajima, 2014; Wang et al., 2018; Azimi & Alavijeh, 2020; Shi et al., 2020; Xiong et al., 2020; Xiong et al., 2021) y finalmente trabajos enfocados a la conservación de los recursos fitogenéticos, pues siendo las colecciones de germoplasma, base de los programas de mejoramiento, es indispensable conservar los recursos fitogenéticos, necesarios en la selección de características de interés (Datta, 2021).

El objetivo del fitomejoramiento de *Hippeastrum* es fijar nuevos atributos florales como follajes brillosos, fragancia en las flores, diferentes tamaños en la flor, nuevos colores y en ciertos casos características no percibidas fenotípicamente como resistencia a plagas y condiciones ambientales (Bell, 1973; Meerow, 2009). Pero, principalmente a causa de su efecto en la apariencia de las flores se da gran relevancia a la altura del pedúnculo floral, el número de flores por pedúnculo, el tamaño de la flor, la longitud y el ancho de las hojas y demás características que son incluidas en la caracterización morfológica de *Hippeastrum*, junto con otros rasgos cualitativos como color, forma de la flor, que son interés ornamental (Hennipman, 1999).

2.8. Cultivares de *Hippeastrum*

Los cultivares de *Hippeastrum* son resultado de selecciones y cruzas hechas durante más de 200 años, sumando hasta ahora más de 600 cultivares comercializados en el mundo (Meerow, 1988; Buta et al., 2013). El registro de la primera variedad ocurrió en Inglaterra en 1799, tras cruzar *Hippeastrum reginae* con *H. vitatum*, el cultivar obtenido lo denominaron *Hippeastrum* x 'Johnsonii'. Posterior a este, se registraron más procedentes de Estados Unidos, Países bajos, Bélgica, Sudáfrica, India e Inglaterra (Datta, 2021).

Teniendo el género dos centros de origen en América, uno en Brasil y otro en Perú; las primeras décadas consistieron principalmente en la importación de especies silvestres desde América a Europa para formar colecciones vivas, seleccionar el material y posteriormente hacer las cruzas (Meerow, 2009). En las etapas iniciales de

fitomejoramiento de *Hippeastrum* fue clave su diversidad genética, que permitió la producción de la amplia gama de genotipos durante los siglos de historia que tiene su fitomejoramiento (Datta, 2021).

En consecuencia, al inicio los cultivares registrados eran escasos y las principales especies empleadas como fuentes de variación fenotípica eran *H. leopoldii*, *H. vittatum*, *H. pardinum*, *H. aulicum*, *H. puniceum* y *H. reginae*; de estas partieron los primeros programas de mejoramiento (Merrow, 2009). Y ya que durante las décadas iniciales de su mejoramiento, las especies protagonizaban las colecciones base, se podía identificar la proveniencia de algunos rasgos; por ejemplo, en el caso de *H. leopoldii* y *H. pardinum* dieron a los cultivares escapos florales largos y flores más abiertas (Meerow, Broschat & Kane, 1990).

Posteriormente, la complejidad y la modificación genética y morfológica incrementaron, al involucrar a los genotipos desarrollados como material parental para obtener nuevas líneas, tras aumentar su variabilidad, se volvieron menos perceptibles los rasgos morfológicos de las especies iniciales (Meerow, 1988; Meerow, Broschat & Kane, 1990).

Actualmente se registran 600 cultivares, siendo los principales desarrolladores Países Bajos y Sudáfrica (Merrow, 2014; Liu & Yeh, 2015). Comercializándose cultivares resistentes a condiciones de estrés, calor y enfermedades, con nuevos patrones de color, flores dobles, escapos florales largos y más numerosos por bulbo, con fragancia, hojas con colores intensos, entre otros rasgos fenotípicos (Hennipman, 1999).

Es frecuente que la aparición de rasgos novedosos marque estándares en el mercado y en los siguientes cultivares se busque incorporarlos (Liu & Yeh, 2015). Actualmente se comercializan muchos cultivares en el mercado y algunos de los más populares son 'Apple Blossom', 'Ster van Holland', 'Orange Sovereign', 'Overingen', 'Red Lyon', 'Telstar', 'Rilona', 'Piquant', 'Ferrari' y 'Picotée' (Tombolato et al., 2007).

Como resultado de la historia de fitomejoramiento de la que es objeto *Hippeastrum* hay una gran variabilidad morfológica, la cual se observa en el tamaño de escapos, forma frontal de flores, tamaño y color floral (Merrow, 2009). Esta situación ha generado

ciertas complicaciones en la organización de los genotipos, pues la gama de cultivares cambia constantemente y surge la necesidad de nuevas categorizaciones. Una clasificación generada para la adecuada identificación entre productores y consumidores, establece la organización de los cultivares de *Hippeastrum* en 9 categorías basadas en el tamaño y forma de las flores (Moerman, Bodegem & Scheepen, 2007; Van Scheepen, Moerman & Bodegom, 2007):

I. Grupo Galaxy: flores simples de porte horizontal con diámetros superiores a 16 cm, superposición mayor al 50 %, tépalos elípticos, ovados u obovados.

II. Grupo Diamond: flores simples de 12-16 cm de diámetro, tépalos ovados, elípticos u obovados.

III. Grupo colibrí: flores simples con diámetro menor a 12 cm, tépalos ovados, elípticos u obovados.

IV. Grupo Doble galaxy: flores dobles con diámetro superiores a 16 cm.

V. Grupo Doble diamond: flores dobles con diámetro de 12-16 cm y solapamiento mayor al 50 %.

VI. Grupo Doble colibrí: flores dobles con diámetro inferior a 12 cm, tépalos superpuestos en más del 50 %.

VII. Grupo Spider: flor simple con tépalos lanceolados o lineares no superpuestos, pistilo y estambres sobresalen de la flor.

VIII. Grupo Butterfly: flor simple de tépalos estrechos elípticos, ovados a obovados superpuestos menos del 50 %. No hay diámetro específico en las flores. El pistilo y estambres tan largos como los pétalos. Por lo general, el plano formado por los pétalos separados forma un ángulo de unos 60 grados con el eje vertical del tallo.

IX. Grupo Trumpet: flor simple con forma de trompeta.

La cantidad de cultivares en el mercado incrementa debido a la selección dirigida de las accesiones y el interés de fitomejoradores en obtener novedosas formas florales, pero sobre todo por la demanda de nuevas características en accesiones decorativas y originales en el mercado (Marasek-Ciolakowska, Sochacki & Marciniak, 2021). Desarrollar nuevos fenotipos florales como color azul, amarillo y verde, flores dobles, presencia de fragancia, resistencia a plagas son algunos de los retos de los fitomejoradores (Meerow, 2014; Liu & Yeh, 2015).

2.9. Estudios en *Hippeastrum*

La variabilidad genética de diferentes cultivares de *Hippeastrum* se ha analizado empleando marcadores morfológicos y moleculares. Entre las técnicas basadas en PCR, los RAPDs son más frecuentes. En 2007, Chakrabarty, Gupta y Datta empleando 7 iniciadores analizaron la variabilidad genética de 24 accesiones obteniendo 59 bandas con 81.35 % de polimorfismo y distancias de similaridad de 0.2-1, en base a las cuales agruparon las accesiones en dos conglomerados principales de 11 y 13 accesiones, con tendencia a agruparse por su origen. Posteriormente, Phuong, Isshiki y Miyajima (2014) caracterizaron 25 accesiones con 25 iniciadores RADP que generaron 230 bandas con 72.6 % de polimorfismo y valores de disimilaridad de 0.008-0.357, que les permitieron identificar 2 conglomerados principales (I-16 y II- 9 accesiones) con tendencia a agruparse por la forma y color de flores. El mismo año Nguyễn et al. (2014) analizaron la diversidad genética de 10 accesiones con 15 iniciadores, obtuvieron 594 bandas con 84.4 % de fragmentos polimórficos, valores de PIC superiores a 0.5 y distancias de similitud de 0.2-0.76 entre accesiones, a partir de las cuales formaron 4 grupos.

En 2012, Zhang, Xu, Cheng, Zhou y Lou con 11 iniciadores ISSR analizaron la variabilidad genética de 62 accesiones; contaron 118 bandas con 92.4 % de fragmentos polimórficos, generados principalmente por UBC834, UBC836, UBC840, UBC850 y UBC857 con 100 % de polimorfismo. Y coeficientes de similitud de 0.3714-0.84, agrupando las accesiones en 7 conglomerados, mostrando algunos grupos asociarse por el color de flores.

También se han empleado los SSR, Wang et al. (2018) amplificaron 21 iniciadores con 104 accesiones, contando 98 alelos con 92 % de fragmentos polimórficos, en el análisis de agrupamiento identificaron 3 grupos (I de 35 accesiones, II-31 y III-38) con tendencia a asociarse por el número de tépalos (simple o doble) y sus colores (blancos, rojos o su combinación).

Recientemente, se han usado SRAPs, Xiong et al. (2020) evaluaron 82 accesiones usando 23 marcadores SRAPs, reportando 242 bandas con 99.5 % de polimorfismos. Agruparon las accesiones en 2 grupos principales que poco se asociaron por las formas florales; pero a su interior, los subgrupos coincidieron con el color de las flores (blanco-verde, naranja, rojo, rosa). Al año siguiente Xiong et al. (2021) analizaron la diversidad genética de 38 accesiones de flores dobles con 28 iniciadores, su amplificación generó 294 bandas con 89.16 % de fragmentos polimórficos. Las accesiones se agruparon en dos conglomerados, uno de ellos de acuerdo con su color; mientras que el otro abarcó accesiones con colores más diversos.

La detección de su variabilidad fenotípica a través de descriptores morfológicos, se ha abordado en algunos trabajos como el presentado por Nascimento et al. (2011), en el que analizaron la variación entre rasgos fenotípicos de 15 accesiones como la longitud y ancho de hojas y flores, número de flores, longitud de pedicelo y pedúnculo floral; datos empleados para agrupar los genotipos en 5 grupos, señalando que la longitud de las hojas y del bulbo son los rasgos que más contribuyen en la variabilidad total.

También está el trabajo de Buta, Cantor, Buta y Horț (2013), quienes evaluaron la dimensión de los tépalos, del pedúnculo floral y las flores para determinar el potencial comercial de accesiones. Posteriormente el de Azimi y Alavijeh (2020) que analizaron 17 características y en base a ellos la varianza entre las accesiones para hacer selecciones preliminares y el mismo año con el estudio de Shi et al. (2020) que describieron la morfología y anatomía de las hojas. Debido a su demanda y popularidad, este recurso tiene un alto potencial en el mercado. Y ya que en el país aún no se desarrollan programas de mejoramiento, es necesario sentar las bases para su desarrollo, partiendo del análisis de las colecciones base como fuente de variabilidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Caracterización molecular

Los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1.1 Extracción de ADN

Siguiendo el método de CTAB, se realizaron las extracciones del ADN. A partir de 0.9 g de muestras frescas de tejido foliar desinfectadas con etanol al 70 %, colectando únicamente tejido foliar que no presentó daños por patógenos o enfermedades. Las extracciones por cada accesión se realizaron por duplicado.

Las muestras se pulverizaron con nitrógeno líquido obteniéndose un macerado uniforme que se colocó en microtubos de 1.5 ml conteniendo 600 µL de amortiguador de extracción CTAB y mercaptoetanol; ambos en una concentración de 0.2 % (20 µl en 10 ml del amortiguador). La mezcla que se calentó a 65° C durante 20 minutos.

Tras dejarlo enfriar en refrigeración a -20 °C durante 10 minutos se centrifugó a 21000 xg durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a los microtubos de 1.5 mL en los que se agregaron 4µL de ARNasa y dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo señalado se agregó cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezcla que, tras agitar levemente los microtubos, se centrifugó a 21000 xg durante 5 minutos con el objetivo de separar la fase acuosa. La fase acuosa se transfirió a nuevos microtubos con 500 µL de isopropanol frío, tras agitarlo levemente se colocaron en refrigeración a -20 °C durante 30 minutos.

Transcurrido el tiempo señalado, el contenido de los microtubos se centrifugó a 21000 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante cuidando que permaneciera al fondo de los microtubos la pastilla del ADN.

Finalmente, los tubos se secaron a 40 °C para evaporar el alcohol, terminado este proceso se disolvió la pastilla de ADN en 50 µL de TE, solución en la que se almacenaron las muestras a 4 °C.

3.1.2 Cuantificación del ADN

La concentración de ADN se cuantificó a una absorbancia de 260 nm midiendo su densidad óptica a través del NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, DNA Factor: 50), registrándose la densidad como $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. La pureza se estimó a partir de la relación entre absorbancias de 280 nm y 260 nm.

Tras registrar el rendimiento de las muestras se seleccionaron aquellas con las concentraciones más altas de ADN y se realizaron diluciones para obtener una concentración final de $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de pureza de ADN a partir de la relación entre absorbancia de 280-260 nm.

| Rango de valores | Pureza del ADN |
|------------------|------------------------------------|
| 1.8 - 2 | ADN pureza óptima |
| 1.6 - 1.8 | ADN pureza aceptable |
| <1.6 | Presencia de compuestos aromáticos |
| >2.1 | Contaminación con ARN |
| <1.5 | Contaminación con sales y fenoles |

3.1.3 Pruebas de calidad

Las muestras seleccionadas ya diluidas se amplificaron con iniciadores específicos para el gen endógeno 16S, posteriormente se hicieron electroforesis con geles de agarosa al 1.8 %, para determinar la calidad del ADN.

Para la reacción de PCR se usaron por cada accesión 2.5 μL de ADN a una concentración de ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 22.5 μL de la mezcla para la reacción. Esta última contenía: 300 μL de agua calidad biología molecular, 640 μL de dNTP's tomados de un stock de 500 μM , 160 μL de amortiguador de un stock de 10X, 192 μL de MgCl_2 de un stock 25 mM, 64 μL de los 2 iniciadores específicos para el gen 16S en una concentración de $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 19.5 μL de Taq ADN polimerasa a $5 \text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.8 % que tras gelificar se introdujeron a la cámara de electroforesis con TAE 0.25X como amortiguador, en cada pozo se

cargaron 8 μL de ADN correspondiente a cada accesión, mezclado con una gota de amortiguador de carga con colorante.

3.1.4 PCR y electroforesis

La amplificación del ADN se realizó con la técnica de marcadores ISSR, cuya temperatura de alineamiento y secuencia se muestra en el Cuadro 2. Por no observarse perfiles definidos se eliminaron UBC848 y LOL10.

Para las reacciones de PCR se usaron por cada accesión 2.5 μL de ADN a una concentración de (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 22.5 μL de la mezcla para la reacción. Esta última contenía: 240.5 μL de agua calidad biología molecular, 650 μL de dNTP's tomados de un stock de 500 μM , 162.5 μL de amortiguador de un stock de 10X, 195 μL de MgCl_2 de un stock 25 mM, 195 μL de los 23 iniciadores ISSR en una concentración de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 19.5 μL de Taq ADN polimerasa a 5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Las reacciones en cadena se realizaron en un termociclador (Veriti Applied Biosystems).

Cuadro 2. Temperatura de alineamiento y secuencia de los iniciadores ISSR.

| Iniciador | Secuencia 5' - 3' | T (°C) | Iniciador | Secuencia 5' - 3' | T (°C) |
|-----------|-------------------------|--------|-----------|----------------------------|--------|
| ISSR1 | (CA) ₈ AAGG | 60 | LOL8 | (GT) ₆ CC | 44 |
| ISSR2 | (CA) ₈ AAGCT | 62 | UBC862 | (AGC) ₆ | 60 |
| ISSR3 | (GA) ₈ CTC | 58 | UBC873 | (GACA) ₄ | 48 |
| ISSR4 | (AG) ₈ CTC | 58 | 17898B | (CA) ₆ GT | 42 |
| ISSR5 | (AC) ₈ CTA | 56 | LOL9 | (CAC) ₃ GC | 38 |
| ISSR6 | (AC) ₈ CTG | 58 | Echt5 | (AGAC) ₂ GC | 42 |
| ISSR7 | (AG) ₈ CTG | 58 | PI03 | AGCT(GACA) ₃ | 48 |
| ISSR8 | (AC) ₈ CTT | 56 | PI01 | (CA) ₆ AGCT | 48 |
| LOL2 | (CT) ₈ GC | 56 | PHV6 | CCA(CT) ₈ | 58 |
| UBC842 | (GA) ₈ CTG | 58 | UBC890 | GACATCGAC(GT) ₇ | 58 |
| UBC866 | (CTC) ₆ | 60 | ISSR9 | (AG) ₈ C | 54 |
| 17899A | (CA) ₆ AG | 42 | | | |

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo corto de 1 minuto a 93 °C de pre-desnaturalización del ADN seguida por 40 ciclos cada uno conformado por tres etapas: desnaturalización a 93 °C, alineación con temperatura específica al iniciador y un ciclo de extensión a 72 °C; terminados los 40 ciclos hubo un ciclo corto de 6 minutos correspondiente a la extensión final.

Los productos de las amplificaciones fueron separados en geles de agarosa al 1.8 %. Estos geles se prepararon con 2.16 g de agarosa y 120 ml de TAE 1X. Tras gelificar se colocaron en la cámara de electroforesis y se agregó TAE 0.25XM como amortiguador de la carga eléctrica. Se cargaron en los pozos las 64 muestras de ADN más un blanco en el cual el ADN fue sustituido por agua con el objetivo de descartar contaminación entre las muestras. En cada pozo se cargaron 8 µL de ADN combinado con gotas de colorante que tienen la función de cambiar la densidad del ADN y adicionalmente se colocó un marcador de peso en los márgenes.

Tras 30 minutos a un voltaje de 170 V, los geles se retiraron y tiñeron con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); para visualizarlos se colocaron en un transluminador de luz UV y documentaron las imágenes de las bandas.

Los patrones de banda se codificaron en una matriz binaria, indicando la ausencia (0) o presencia (1) de bandas.

3.1.5 Análisis estadístico

Se obtuvieron la descriptiva de los marcadores indicando el número de bandas polimórficas (BP), el número de bandas monomórficas (BM), la proporción de loci polimórficos (PMF (95)), el contenido de información polimórfica promedio (PIC), el porcentaje de amplificación (AMP) y la probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) con el programa Infogen® de la Universidad de Córdoba, Argentina.

Con el propósito de explorar la variabilidad genética existente entre las 64 accesiones evaluadas se procedió a calcular la distancia genética de Jaccard entre pares de

colectas y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward y se obtuvo el dendrograma correspondiente. La altura de corte se definió mediante los valores de la pseudo estadística t_2 (Hotelling, 1951) y la pseudo F (Johnson, 1998). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.4.

3.2 Caracterización morfológica

3.2.1 Material vegetal

Las 64 accesiones de *Hippeastrum* fueron obtenidas comercialmente por la academia de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo ubicados en invernaderos del mismo Departamento en los 19°29'22.9" Latitud Norte y 98° 53'19.5" Longitud Oeste a una altura de 2252 msnm. Se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con luz natural a una temperatura media de 23°C y se identificaron desde A1 hasta la A64.

Las plantas de *Hippeastrum* estaban establecidas en camas y macetas; el sustrato fue una mezcla de suelo normal 80% mezclado con 20 % materia orgánica proveniente de hojas. Los datos se tomaron durante el periodo de floración en los meses de febrero e inicios de mayo de año 2021. De la población se seleccionaron ejemplares morfológicamente similares, correspondientes a las tres repeticiones.

3. 2. 2 Descripción morfológica

Las accesiones se caracterizaron en distintos momentos de acuerdo con la estructura evaluada. Las observaciones del cáliz se realizaron antes de la antesis floral y el color de las anteras se determinó antes de la maduración del polen. Mientras que las flores se describieron tras la apertura de las anteras para registrar el tamaño máximo de la flor y se seleccionaron las hojas largas presentes durante la antesis.

La caracterización se realizó siguiendo los 39 descriptores morfológicos presentados en las directrices de amarilis (*Hippeastrum*) de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) y descriptores propuestos por Tombolato et al. (2007) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lista de los descriptores evaluados en 64 accesiones de amarilis.

| Descriptores morfológicos cualitativos, pseudocualitativos y cuantitativos | |
|--|--|
| Hojas. | Longitud y anchura (cm). |
| Pedúnculo floral | Altura y anchura máxima en el tercio central (cm). |
| Pedicelo | longitud y anchura (cm). |
| Número de flores por inflorescencia. | |
| Flor | Longitud, anchura y altura máxima del perianto (cm) |
| Cabeza estigmática: | Anchura y longitud (cm) |
| Grado de coloración antociánica en: cáliz, pedúnculo y pedicelo. | Muy débil, débil, medio, fuerte, muy fuerte. |
| Distribución de coloración antociánica en pedúnculo. | Zona basal, distal o entero |
| Porte de tépalos. | Horizontal, ligeramente, moderadamente o fuertemente inclinado. |
| Forma frontal de la flor. | Estrella, redonda, triangular. |
| Intensidad de color verde en el cáliz. | Muy débil, débil, medio, fuerte, muy fuerte |
| Forma de tépalos: exteriores, laterales e inferiores. | Ovada ancha, ovada, ovada estrecha, elíptica ancha, elíptica, elíptica estrecha, obovada ancha, obovada, obovada estrecha. |
| Grado de arrugado y ondulación en márgenes de tépalos. | Débil, medio, fuerte. |
| Conspicuidad de las nervaduras. | Ausente, débil, medio, fuerte, muy fuerte. |
| Colores principales y secundarios de tépalos internos y externos, | Determinados con la carta de colores RHS. |
| Color del pistilo, estambres y antera. | Determinados con la carta de colores RHS. |

Cuadro 3. Lista de descriptores evaluados en 64 accesiones de amarilis (Continuación).

| Descriptores morfológicos cualitativos, pseudocualitativos y cuantitativos | |
|--|--|
| Forma del ápice de tépalos externos. | Redondo, agudo, acuminado. |
| Distribución del color. | Monocolor, moteada, flameada, picote, rayada y manchada. |
| Incisiones en tépalos laterales. | Ausente, poco profundo, medio, profundo, muy profundo |
| Solapado de tépalos. | Débil, medio, fuerte |

3. 2. 3 Determinación de colores

En la valoración del color se empleó la carta de colores RHS propuesta por la UPOV (UPOV, 2001; UPOV, 2021). La determinación de colores en las flores, pistilo y anteras se hizo durante las mismas horas del día, en condiciones de luz natural y sin luz de sol directa.

Los colores identificados se registraron con su número de referencia RHS, especificando el grupo de color correspondiente. Los resultados se consignaron en una matriz de datos

Las accesiones se identificaron con una nomenclatura alfanumérica (una letra mayúscula y un número). Asimismo, cada accesión se fotografió para su registro en la base de datos.

3. 2. 4 Análisis estadístico

Se estimó la media, desviación estándar, varianza y sus valores máximos y mínimos para observar el comportamiento de las accesiones con respecto a los rasgos fenotípicos. Se realizaron análisis de covarianza sucesivas para detectar la colinealidad entre los descriptores evaluados y omitir los que estuvieron correlacionados.

Se calculó la distancia genética de Gower entre pares de accesiones y se llevó a cabo un análisis de agrupamiento mediante el método de la varianza mínima de Ward. Se obtuvo un dendrograma y la altura de corte se definió considerando los estadísticos pseudo t^2 (Hotelling, 1951) y pseudo F (Johnson, 1998). Con el objetivo de corroborar el número de grupos formados e identificar las principales variables discriminantes (VD) responsables de la agrupación, se llevó a cabo un análisis discriminante canónico.

Para corroborar el aporte de los rasgos morfológicos a la variabilidad total y su importancia relativa en el agrupamiento de las accesiones se realizó un análisis de componentes principales y se hicieron comparaciones entre las medias de grupos para estimar su variación y diferencia significativa. Todos estos análisis se realizaron con el programa SAS 9.4.

3. 3 Análisis entre agrupamientos.

Con el fin de comparar los dendrogramas obtenidos a partir de la caracterización morfológica y molecular e identificar los materiales con mayor potencial para futuros programas de mejoramiento, se hizo un análisis entrecruzado, estimando las medias y las varianzas de los grupos generados mediante el programa SAS versión 9.4.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización molecular

4. 1. 1 Cuantificación y pureza del ADN

La pureza y rendimiento del ADN de las 64 accesiones y sus duplicados se cuantificaron en el NanoDrop con base en su capacidad de absorbancia. El rendimiento de cada accesión osciló entre 300-1900 ng μL^{-1} y la pureza estimada de la relación entre la absorbancia de 280nm y 260 nm, mostró en el 19 % de las accesiones una tendencia a estar contaminada por sales y fenoles, en el 19 % sugirió la presencia de compuestos aromáticos y el 62 % restante manifestó una pureza aceptable.

En los geles de calidad se amplificó el gen endógeno 16S de las 64 muestras, observándose en todos los casos una banda clara y definida correspondiente al gen y sólo en dos de las accesiones se apreciaron ligeros barridos.

La cantidad de ADN obtenida de las muestras fue óptima considerando que para una PCR se necesitan mínimo de 10 a 200 ng y aunque en los criterios de evaluación de la pureza del ADN se encontraron valores que sugerían la existencia de potenciales contaminantes, el bandeo claro en los geles de calidad demostró la integridad del ADN y la ausencia de inhibidores que pudieran impedir la amplificación (Velázquez, Martínez & Romero, 2014). Los resultados obtenidos demostraron que el método de extracción CTAB de ADN fue óptimo para trabajar con amarilis (*Hippeastrum*).

4. 1. 2 Descriptiva de los marcadores moleculares

Se generaron 167 bandas de la amplificación de 23 iniciadores; hubo 2 bandas duplicadas, 20 monomórficas y el 88.02 % de los fragmentos fueron polimórficos con un promedio de 7 bandas polimórficas por iniciador (Cuadro 4).

En el presente trabajo los iniciadores que más bandas amplificaron fueron ISSR1 y ISSR3 (13 bandas) con 42.67 % y 45.55 % de amplificación a través de las 64 accesiones, seguidos por ISSR6 (12 bandas) con 56.51 % de amplificación; siendo en los tres iniciadores, el 100 % de sus bandas polimórficas. Los iniciadores con menos bandas polimórficas (1 a 2) fueron LOL8, PIO1 y UBC862 con porcentajes de amplificación de 90.6 %, 68.4 % y 69.14 %, respectivamente (Cuadro 4).

Los iniciadores que mostraron los valores máximos de contenido de información polimórfica (PIC) fueron ISSR1, PI01, PVH6, LOL8, LOL9 y UBC862, siendo los de mayor capacidad para distinguir entre las accesiones de acuerdo con la información obtenida de los alelos. De acuerdo con el rango teórico de PIC para marcadores dominantes (0.01-0.5), valores superiores a 0.25 corresponden a iniciadores altamente informativos que permiten discriminar entre las 64 accesiones (Botstein, Skolnick & Davis, 1980) (Cuadro 4).

En el caso de UBC890 e ISSR9 que amplificaron únicamente bandas monomórficas, se puede indicar que los segmentos comprendidos entre las secuencias complementarias a GACATCGAC(GT)₇ y (AG)₈C se encuentran en todas las accesiones sin cambios que puedan ser detectados por los iniciadores ISSR y la resolución empleada, es decir, que en las accesiones dichas secuencias han sufrido pocos o ningún cambio.

Contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio, Zhang et al. (2012) obtuvieron de 8-13 bandas polimórficas con iniciadores de la Universidad de British Columbia (UBC) mientras que en este trabajo se observaron de 0 a 11 bandas. La visualización de bandas producto de la amplificación con los iniciadores UBC862, UBC866 y UBC873 refleja la presencia de secuencias repetidas complementarias a los motivos (AGC)₆, (CTC)₆ y (GACA)₄ a distancias amplificables en las accesiones de ambas colecciones.

Cuadro 4. Descriptiva de los 23 iniciadores ISSR utilizados para caracterizar 64 accesiones de amarilis.

| Iniciador | Secuencia | BP | BM | PMF(95) | PIC | AMP | PDICMA |
|-----------|----------------------------|----|----|---------|------|--------|---------|
| ISSR1 | (CA) ₈ AAGG | 13 | 0 | 1.00 | 0.35 | 42.67 | 5.0E-16 |
| ISSR2 | (CA) ₈ AAGCT | 8 | 0 | 1.00 | 0.28 | 39.06 | 5.2E-12 |
| ISSR3 | (GA) ₈ CTC | 13 | 0 | 1.00 | 0.31 | 45.55 | 7.6E-13 |
| ISSR4 | (AG) ₈ CTC | 7 | 0 | 0.86 | 0.25 | 51.56 | 9.2E-10 |
| ISSR5 | (AC) ₈ CTA | 5 | 1 | 0.50 | 0.18 | 65.63 | 4.1E-05 |
| ISSR6 | (AC) ₈ CTG | 12 | 0 | 0.92 | 0.27 | 56.51 | 3.1E-10 |
| ISSR7 | (AG) ₈ CTG | 11 | 0 | 1.00 | 0.28 | 52.98 | 1.3E-11 |
| ISSR8 | (AC) ₈ CTT | 12 | 1 | 0.92 | 0.26 | 62.50 | 3.5E-09 |
| LOL2 | (CT) ₈ GC | 10 | 0 | 0.90 | 0.27 | 53.75 | 2.3E-10 |
| UBC842 | (GA) ₈ CTG | 10 | 0 | 1.00 | 0.30 | 61.41 | 1.1E-11 |
| UBC866 | (CTC) ₆ | 11 | 0 | 1.00 | 0.31 | 66.90 | 1.3E-11 |
| 17899A | (CA) ₆ AG | 3 | 1 | 0.50 | 0.19 | 76.17 | 8.9E-05 |
| LOL8 | (GT) ₆ CC | 1 | 3 | 0.25 | 0.36 | 90.63 | 1.7E-03 |
| UBC862 | (AGC) ₆ | 2 | 3 | 0.40 | 0.37 | 78.44 | 2.5E-05 |
| UBC873 | (GACA) ₄ | 4 | 2 | 0.50 | 0.26 | 82.03 | 3.7E-06 |
| 17898B | (CA) ₆ GT | 5 | 0 | 1.00 | 0.33 | 57.81 | 2.9E-14 |
| LOL9 | (CAC) ₃ GC | 3 | 2 | 0.60 | 0.36 | 73.13 | 5.9E-08 |
| Echt5 | (AGAC) ₂ GC | 6 | 0 | 1.00 | 0.31 | 47.40 | 4.2E-13 |
| PI03 | AGCT(GACA) ₃ | 6 | 0 | 1.00 | 0.29 | 69.53 | 1.5E-13 |
| PI01 | (CA) ₆ AGCT | 2 | 2 | 0.50 | 0.36 | 69.14 | 4.1E-06 |
| PHV6 | CCA(CT) ₈ | 3 | 1 | 0.750 | 0.36 | 71.88 | 1.1E-10 |
| UBC890 | GACATCGAC(GT) ₇ | 0 | 1 | 0.00 | 0.00 | 100.0 | 1 |
| ISSR9 | (AG) ₈ C | 0 | 3 | 0.00 | 0.00 | 100.00 | 1 |

BP: bandas polimórficas, BM: bandas monomórficas, PMF (95): proporción de loci polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica promedio, AMP: porcentaje de amplificación, PDICMA: probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

A su vez, las diferencias en el número de loci totales y polimórficos (a excepción del motivo (AGC)₆) reflejan altos niveles de variación entre accesiones. Dichas variaciones, en las longitudes de las secuencias intermedias y su frecuencia, pueden deberse a mutaciones aleatorias o inducidas por inserción o delección de fragmentos de ADN o por rearrreglos en las cadenas de ADN al combinar información de parentales en diferentes ciclos llevados a cabo durante el desarrollo de programas de mejoramiento. Las modificaciones ocasionan que los iniciadores no reconozcan ciertas secuencias como un mismo locus y en consecuencia varía su frecuencia o las longitudes de los segmentos intermedios (Meerow, 1988; Pradeep-Reddy, Sarla & Siddiq, 2002; González & Aguirre, 2007).

En el estudio realizado por Zhang et al. (2012) 60 fueron cultivares desarrollados en Holanda y los dos restantes en China; mientras que en el presente trabajo la Academia de Floricultura de la Universidad Autónoma Chapingo contaba con una población de género *Hippeastrum* obtenida comercialmente y entre las accesiones se realizaron algunas cruces. En ambos casos, las accesiones presentan alta variabilidad genética, posiblemente como resultado del manejo de fitomejoradores para comercializar el material con la combinación e incorporación de genes a la descendencia al buscar mejorarlas y al seleccionar el material parental potencial para obtener nuevas líneas que presenten los rasgos de interés (Meerow, Broschat & Kane, 1990; Kamenetsky & Okubo, 2012; Swarup et al., 2021).

Por otro lado, ISSR1 presentó la probabilidad más baja de que dos accesiones compartan el mismo alelo por azar ($5.0E-16$), seguido por los iniciadores 17898B, PIO3, ISSR3, Echt5, UBC842, UBC866, ISSR7 y PHV6; por lo que estos, principalmente ISSR1, mostraron un alto grado de confianza en la identificación de accesiones. Contrario al iniciador LOL8 que presentó la menor capacidad discriminatoria ($1.7E-03$) en comparación con los demás iniciadores (Cuadro 4).

Comparado con estudios realizados en la caracterización genética de materiales de *Hippeastrum* con la técnica molecular RAPDs, han obtenido un menor porcentaje de polimorfismo (81.35 %) al reportado en el presente trabajo y con SSR se ha registrado

alto porcentaje polimórfico pero menor número de bandas totales que en este estudio (Phuong, Isshiki & Miyajima, 2014; Wang et al., 2018). Mientras que la utilización de los ISSR es más común debido a su nivel de reproducibilidad elevada, su bajo costo, su uso simple, que no requiere conocerse previamente la secuencia del ADN y a que existen iniciadores específicos probados en distintas especies de plantas (Idrees, & Irshad, 2014). En este trabajo y el realizado por Zhang et al. (2012) el número de bandas totales (167 y 118 bandas respectivamente) y los porcentajes de polimorfismo (88.02 % y 92 %) permitieron conocer la variabilidad genética del material. Y los valores obtenidos de información polimórfica y de PIC en este estudio demostraron la efectividad de la técnica ISSR como herramienta en la caracterización genética de *Hippeastrum*.

Las técnicas moleculares basadas en PCR tienen distintas características que influyen en su eficiencia para la detección de variabilidad genética. Por ejemplo, los SSR son específicos y codominantes, por lo que se requiere conocer previamente la secuencia a amplificar para poder diseñar los iniciadores específicos, volviendo esta técnica más compleja. Por su parte los RAPD, ISSR y SRAP son aleatorios y dominantes; entre las tres técnicas, los ISSR y SRAP detectaron más bandas polimórficas que los RAPDs. Sin embargo, siendo los SRAP de reciente creación, su uso no es muy frecuente (Staub & Serquen, 1996; Alcántara, 2007; Roberts & Wolfe, 2014).

El polimorfismo obtenido con las distintas técnicas moleculares es resultado de la variabilidad genética propia de las accesiones; variabilidad que el ser humano busca y aprovecha para fijar nuevas características que hagan únicos a los cultivares y puedan ser susceptibles a comercializarse (Phuong, Isshiki & Miyajima, 2014; Xiong et al., 2021). Los programas de mejoramiento buscan que sus colecciones estén integradas por cultivares con alta variabilidad genética que permitan fijar rasgos novedosos (Meerow, Broschat & Kane, 1990).

4. 1. 3. Análisis de agrupamiento

Se estimaron las distancias genéticas de Jaccard entre pares de accesiones, las cuales oscilaron entre 0.305 a 0.82. La menor distancia se encontró entre A12 y A9, mientras que la mayor distancia ocurrió entre A28 y A8 (Figura 1).

Las distancias de disimilitud encontradas son similares a las reportadas por Nguyễn et al. (2014) y Zhang et al. (2012) en cultivares de *Hippeastrum*. Los rangos obtenidos en este trabajo demuestran la alta variabilidad entre accesiones, cualidad que puede ser usada para organizar la colección base para futuros programas de mejoramiento, además de mostrar las relaciones genéticas entre accesiones. A su vez, los resultados reflejan la efectividad y capacidad de los iniciadores ISSR seleccionados para demostrar la variabilidad genética, siendo también una técnica rápida y simple (Pradeep-Reddy, Sarla & Siddiq, 2002).

Con base en la matriz de distancias de disimilitud y utilizando el método de agrupamiento de la varianza mínima de Ward, fue posible diferenciar entre sí las 64 accesiones evaluadas las cuales se congregaron en 3 grupos principales: el grupo I conformado por 38 accesiones, el grupo II con 24 accesiones y finalmente el grupo III que incluyó las 2 accesiones restantes (Figura 1). La línea de corte del dendrograma de 0.042 se determinó mediante el estadístico pseudo-F (Johnson, 1998) y el pseudo-t² (Hotelling, 1951) utilizando el paquete estadístico SAS ver 9.4.

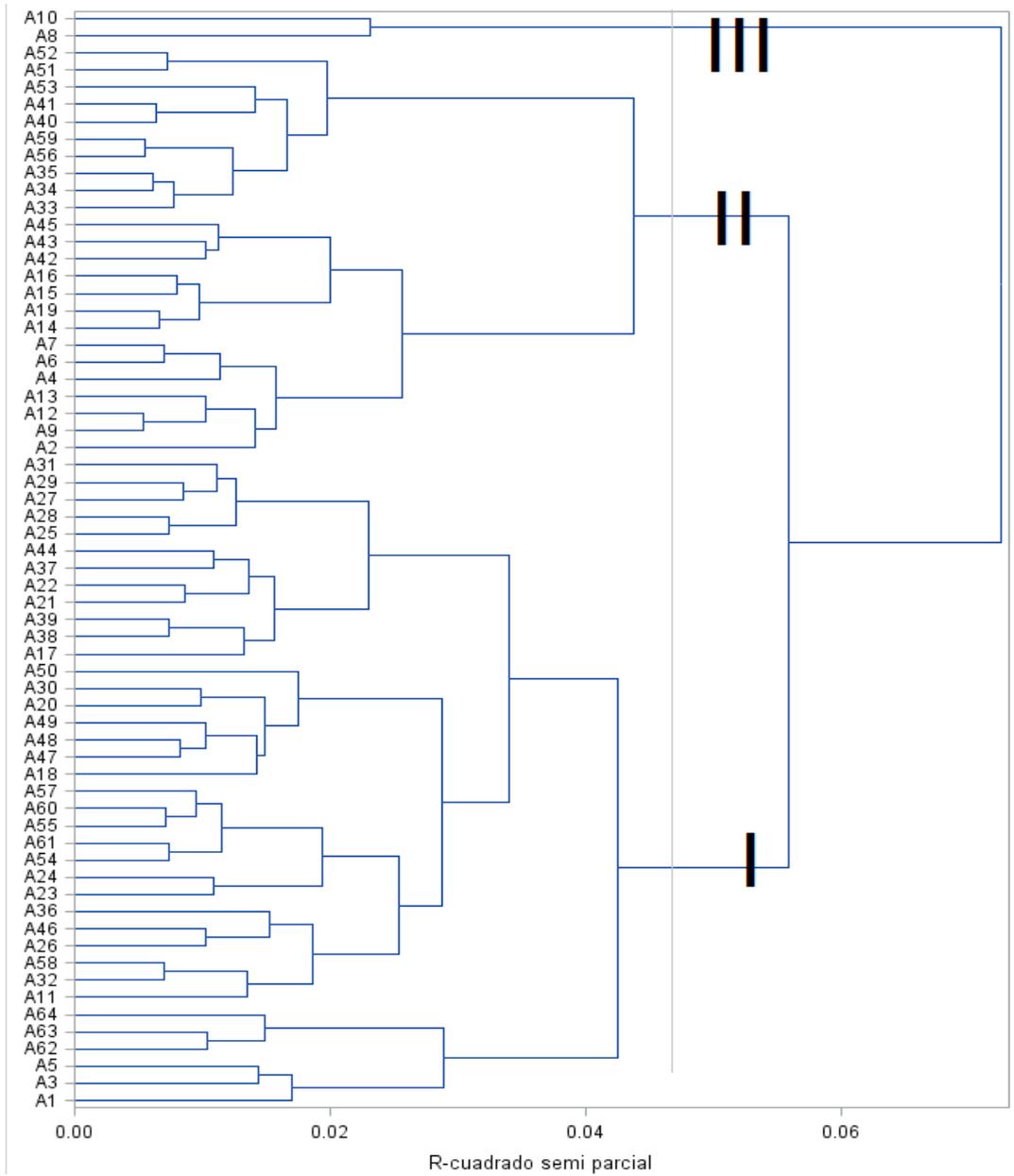


Figura 1. Dendrograma construido a partir de la distancia de Jaccard y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward

En trabajos previos realizados con RAPDs, Phuong et al. (2014) identificaron 2 grupos principales y Zhang et al. (2012) con ISSR encontraron 7 grupos; ambas agrupaciones relacionadas con el color, la forma y el tamaño de la flor. Por su parte Xiong et al. (2020) al utilizar marcadores SRAP (Polimorfismo amplificado relacionado con la secuencia) para caracterizar 38 cultivares de flores dobles de *Hippeastrum*, encontraron mayor asociación en los subgrupos que los grupos principales, relacionándolos con el color de las flores y su origen geográfico. Por su parte Wang et al. (2020) con 98 loci SSR encontraron tres grupos, usando como criterio de clasificación predefinido la presencia de flores simples o dobles.

En el presente trabajo si bien se identificaron también 3 grupos principales, éstos no guardaron relación con el color o forma de las flores. Así en el Grupo I se integraron accesiones de patrones veteados, rayados, flameados y monocolor con formas florales triangulares, redondas y de estrella, en una amplia gama de colores que van desde el rojo, rojo-naranja hasta el blanco y esta misma situación se presentó en los otros dos grupos y analizando los subgrupos se encontraron complejidades similares.

Sin embargo, se observó que otro descriptor morfológico podría ser indispensable en la agrupación, pues hay una tendencia en las accesiones de asociarse con base en la anchura de las flores. El grupo I incluye 61 % de accesiones con anchura que va desde los 12 a 15 cm, sólo 3 % superan los 16 cm y 36 % presentan anchos menores a 12 cm. Por su parte el grupo II comprende 54 % de las accesiones que muestran una anchura que va de 12-15 cm, 38 % presenta diámetros próximos o superiores a los 16 cm y únicamente el 8 % tiene valores inferiores a 12 cm. Finalmente el grupo III incluyó el 100 % de accesiones con diámetros menores a 12 cm. Estos resultados sugieren que la anchura de las flores podría ser un criterio para explicar las relaciones genéticas de las accesiones; pues en general, el 92 % de las accesiones del grupo II superan los 12 cm e incluye a la mayoría de las accesiones con anchos que superan los 16 cm; el Grupo I congrega al 64 % de las accesiones mayores a 12 cm y únicamente el 3 % supera los 16 cm y el Grupo III ninguna accesión supera a los 12 cm.

Aunque en el presente estudio no se incluyeron flores dobles es evidente la complejidad y variabilidad del material que integra la colección, ya sea por las diferentes formas florales, colores principales/secundarios, número de flores por inflorescencia o demás rasgos que son los objetivos del mejoramiento y desarrollo de nuevos cultivares.

Gran parte de la complejidad hallada es resultado del trabajo que durante más de 200 años han realizado fitomejoradores para el desarrollo de nuevos cultivares que presenten características deseables (Meerow, 1988). En las primeras décadas las especies silvestres de *Hippeastrum* eran los parentales, las cuales eran importadas de países del Sur de América a Europa; en la actualidad los parentales son los cultivares desarrollados y en las colecciones base de los programas de mejoramiento se busca que contengan alta variabilidad genética (Meerow, 2009; Datta, 2021).

Los principales objetivos en el mejoramiento de *Hippeastrum* son aumentar la variación de los colores, tamaños florales y patrones de coloración, lo cual vuelve más complicado explicar las relaciones entre accesiones de *Hippeastrum*, pero ello incrementa la variabilidad de las colecciones lo que puede hacer más eficaz la planeación de futuros programas de mejoramiento (Liu & Yeh, 2015). El conocimiento del nivel de variabilidad y relaciones genéticas posibilitan la selección adecuada de material, eligiendo accesiones con rasgos deseables (Xiong et al., 2021).

4. 2 Caracterización morfológica

4. 2. 1 Descripción de rasgos morfológicos

Con los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de las accesiones se llevó a cabo un análisis de covarianza sucesiva, el cual mostró que los rasgos fenotípicos no presentaron colinealidad y permitieron la discriminación de las accesiones, por lo que no se omitió ninguna de las características evaluadas para la descripción de la variabilidad existente.

Se obtuvieron las medias para los rasgos y se realizó una prueba de F entre ellas, encontrándose que existieron diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$) entre accesiones para todos los rasgos morfológicos (Cuadro 5). En la época de floración los cultivares de *Hippeastrum* presentan las variaciones morfológicas clave para su diferenciación, lo cual se puede observar en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Media, desviación estándar, valor máximo y mínimo obtenido de doce rasgos morfológicos cuantitativos evaluados en las 64 accesiones.

| Variable | Media | DS | Mín | Máx | CV | DMSH |
|---|-------|-------|-----|--------|-------|------|
| Longitud máxima del perianto (cm) | 11.67 | 1.39 | 7 | 15 * | 6.31 | 2.54 |
| Altura frontal (cm) | 13 | 2.04 | 8 | 19 * | 5.77 | 2.58 |
| Anchura máxima del perianto (cm) | 13.36 | 2.15 | 8 | 18.5 * | 4.20 | 1.93 |
| Longitud del pedicelo (cm) | 2.91 | 1.21 | 0.5 | 8 * | 14.04 | 1.91 |
| Pedúnculo: altura (cm) | 40.04 | 7.86 | 20 | 57 * | 7.01 | 9.66 |
| Pedúnculo: anchura máxima en el tercio central (cm) | 1.62 | 0.46 | 0.5 | 3.5 * | 15.65 | |
| Hoja: anchura (cm) | 3.14 | 1.1 | 1 | 6.5 * | 12.82 | 1.39 |
| Hoja: longitud (cm) | 29.64 | 12.95 | 6.5 | 58 * | 7.61 | 7.66 |
| Anchura del pedicelo | 0.56 | 0.16 | 0.3 | 1.2 * | 2.58 | 0.40 |
| Estigma: anchura (cm) | 0.48 | 0.31 | 0.1 | 2.1 * | 26.52 | 0.44 |
| Estigma: altura (cm) | 0.54 | 0.22 | 0.2 | 1.6 * | 18.37 | 0.34 |
| Número de flores | 2.94 | 1.05 | 2 | 6 * | 1.5 | 0 |

* Valores estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; DMSH: diferencia mínima significativa honesta; Min: valor mínimo del rasgo morfológico; Máx: valor máximo del rasgo.

Buta, Cantor, Buta y Horç (2013) trabajando con 4 cultivares encontraron hojas con longitudes mínimas de 46 y máximas de 54 cm. Por su parte, Nascimento et al. (2011) registraron longitud mínima de hojas de 42 cm y una máxima de 80 cm mientras que Azimi y Alavijeh (2020) mencionaron entre 11.08 y 68.33 cm con anchuras de 2.3 cm a 4.5 cm (Nascimento et al., 2011), de 4.3 cm a 8 cm (Shi et al., 2020) y de 3.66 cm a 7.50 cm; con relación a los pedúnculos florales indicaron alturas de 41 cm a 54 cm

(Buta et al., 2013), de 48 cm a 72 cm (Nascimento et al., 2011) y de 33 cm (Fishchuk, 2021); pedicelos con longitudes de 4.2 cm a 8.5 cm (Nascimento et al., 2011), de 2.33 cm y 8 cm (Azimi & Alavijeh, 2020) y de 1.3 cm con anchos de 0.3 cm (Fishchuk, 2021); flores con longitudes de 8.5 cm a 25 cm (Nascimento et al., 2011), de 10.66 cm a 22 cm (Azimi & Alavijeh, 2020) y de 6.2 cm a 8.2cm (Fishchuk, 2021) y anchos de 10.66 cm a 22.66 cm (Azimi & Alavijeh, 2020); cabezas estigmáticas de 0.5 cm de largo y 0.3 cm de ancho (Fishchuk, 2021).

Algunos rasgos morfológicos evaluados en el presente trabajo presentaron dimensiones muy reducidas en comparación con las reportadas, como fue el caso de la longitud de las hojas ya que se encontraron mínimos de 6.5 cm, de los pedúnculos florales cortos de 20 cm, los pedicelos con longitudes de 0.5 cm, las cabezas estigmáticas con anchura de 0.1 cm y hojas de 1 cm. de ancho. A pesar de ello, las dimensiones máximas de cada rasgo floral quedaron dentro de los intervalos antes publicados.

4. 2. 2 Análisis de componentes principales

Con los datos morfológicos se llevó a cabo un análisis de componentes principales, mediante el cual se identificaron cinco componentes principales que explicaron el 70 % de la variación fenotípica observada, mayor al 60 % encontrando por Nascimento et al. (2011) con tres CP, pero menor al 88 % explicado con seis CP por Azimi y Alavijeh (2020).

El reducir la explicación de la variabilidad fenotípica existente en los descriptores evaluados a sólo cinco CP cumple ampliamente con el principal objetivo del análisis de componentes principales (Johnson, 1998: Núñez-Colín & Barrientos-Priego, 2006).

El primer CP contribuyó al explicar el 29 % de la variabilidad total correspondiendo a los características que más aportan a la variabilidad morfológica que son los rasgos florales como la longitud máxima (0.40), la altura frontal (0.37) y la anchura máxima del perianto (0.36); el segundo CP explicó el 12 % y estuvo asociado al ancho y la longitud (-0.53 y -0.45) de la cabeza estigmática y a la longitud de la hoja (0.39); el tercer CP (11 %) se relacionó con el número de flores (0.52) y con la altura del pedúnculo floral (-0.51); al

cuarto CP (10 %) contribuyen el ancho del pedúnculo floral (0.62), del pedicelo (0.42) y de las hojas (0.40) y el quinto CP (8 %) se relacionó a la longitud del pedicelo (0.48) y la altura frontal de la flor (-0.42).

Los rasgos fenotípicos asociados a los CP identificados en el presente trabajo difieren con los señalados por Nascimento et al. (2011), quienes indicaron que la longitud de las hojas y el número de flores totales y abiertas, fueron las características que mejor explicaron la variabilidad de las 15 accesiones que analizaron. Sin embargo, estos resultados son similares a los obtenidos por Azimi y Alavijeh (2020), quienes encontraron que el primer CP explicó el 28.60 % de la variabilidad total y aunque también incluyeron en este CP el periodo de floración, las características con los coeficientes más altos fueron el ancho y la longitud de las flores, los cuales denominan factor floral. Los siguientes cinco CP presentaron concordancia con algunos de los rasgos asociados, tales como la altura y el ancho del pedúnculo floral (segundo CP) ubicados en el tercer y cuarto CP; el número de flores (sexto CP) incluido en el tercer CP; la longitud y ancho de las hojas (tercer CP) contemplados en el segundo y cuarto CP.

La concordancia entre estos resultados demuestra que, aunque los rasgos morfológicos evaluados contribuyen en diferente proporción a la variabilidad según la arquitectura floral de las accesiones de ambas colecciones, son los rasgos fenotípicos con los coeficientes de contribución más altos en la variabilidad genética, por lo que deben considerarse durante la selección de accesiones a incorporar a futuros programas. Y sobre todo en ambos trabajos destaca la coincidencia de la asociación de las características florales con el primer CP que explica cerca del 29 % de la variabilidad total, poniendo en evidencia el papel clave que tienen el ancho, longitud y largo de la flor en la discriminación de los genotipos. A su vez, podemos relacionarlos con la clasificación de Moerman, Bodegem y Van Scheepen (2007) y Van Scheepen, Moerman y Bodegom (2007), basada en el ancho de las flores.

4. 2. 3 Análisis de agrupamiento y discriminante

Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento usando la distancia de disimilitud genética de Gower entre pares de accesiones, las cuales variaron entre 0.18 a 0.49 (A52-A47). La altura de corte del dendrograma de 0.089 se determinó con base con los estadísticos de la pseudo t² (Hoteling, 1981) y la pseudo F (Johnson, 1998) usando el paquete estadístico SAS ver. 9.4. Con base en ello se estimaron 3 grupos (Figura 2).

El análisis discriminante identificó dos VD que explicaron el 90 % de la variabilidad existente entre las 64 accesiones.

La primera VD explicó el 62 % de la variabilidad total y estuvo constituida por la longitud del pedúnculo, altura frontal de la flor, ancho de la hoja y de la flor de manera positiva, mientras que se asoció de manera negativa con la longitud de la cabeza estigmática. La segunda VD explicó el 37 % de la variabilidad total y estuvo conformada por valores positivos del número de flores y ancho del pedicelo, y asociada negativamente con la longitud del pedicelo.

El análisis discriminante permitió corroborar el agrupamiento, indicando que los tres grupos conformados explicaron el 72 % de la variabilidad, reubicando 18 accesiones por restitución a partir de las variables explicativas basadas en la función lineal discriminante.

Azimi y Alavijeh (2020) y Nascimento et al. (2011), identificaron cuatro grupos y cinco grupos, respectivamente, mientras que en el presente trabajo se identificaron sólo tres. La variación fenotípica explicada a través de los descriptores morfológicos permite clasificar las accesiones caracterizadas, agrupando dentro de un mismo grupo a aquéllas más similares entre sí y dentro de grupos distintos a las que presentaron un mayor grado de disimilitud.

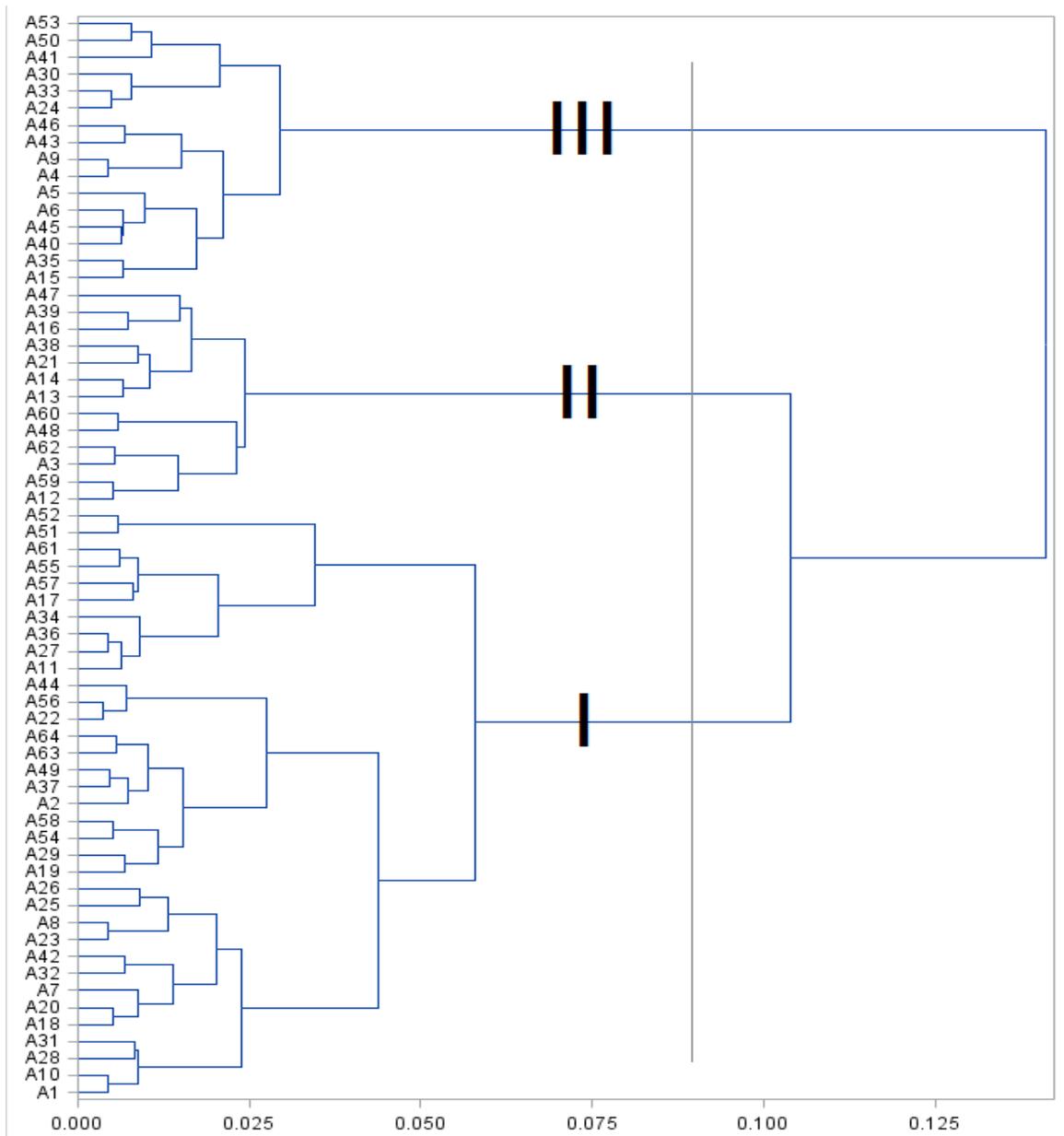


Figura 2. Dendrograma de accesiones de amarilis construido a partir de la distancia de Gower y el método de agrupamiento de la varianza mínima de Ward.

4. 2. 4 Descripción de grupos

En las especies ornamentales la variación morfológica se refleja en la arquitectura de la flor y demás estructuras vegetales. La selección de los estados dentro de cada rasgo morfológico está dirigida por el interés ornamental de hacer visualmente más atractivos los genotipos (Benschop, Kamenetsky, Le Nard, Okubo & De Hertogh, 2010). En las accesiones analizadas en este trabajo es evidente la amplia variación en los rasgos fenotípicos, considerados todos polimórficos.

La descripción de los tres grupos identificados fue la siguiente:

Grupo I. Flores con forma frontal de estrella (73 %). En tépalos dominó el rojo como color principal exterior (72 %), el verde (60 %) como color principal interior y el blanco como color secundario exterior (41 %), dispuestos en patrones flameados y veteados (62 %) con nervaduras poco visibles (43 %). Los tépalos exteriores tuvieron una forma ovada y elíptica (58 %), tépalos medios ovados (47 %) e inferiores elípticos estrechos (66 %) con ápices acuminados y agudos (89 %). Tépalos sin solapamiento (77 %) ni incisiones (80 %) con ondulación media en márgenes (43 %) y arrugas débiles sobre su superficie (66 %). Extremos superiores de los estambres fueron rojos (77 %) y el color de los pistilos fue rojo (49 %) y naranja-rojo, mientras que las anteras fueron amarillas, se presentó una intensidad media de antocianinas en las hojas (49 %) y fuerte en el pedicelo (49 %). Distribución basal de antocianinas en el pedúnculo (46 %).

Grupo II. Flores de forma triangular (54 %). En tépalos dominó el blanco como color principal exterior (77 %), el verde (62 %) como color principal interior y el naranja-rojo como secundario (42 %) en patrones rayados y manchados (77 %) con nervaduras poco visibles (77 %). Tépalos exteriores de forma ovada ancha (62 %) con ápices acuminados (47 %); de porte horizontal (54 %) con solapamiento medio (77%) y fuertemente arrugados (54 %). Base amarilla-verde (62 %) en pistilos y filamentos con extremos superiores blancos (92 %) y anteras amarillas. Coloración de antocianinas débil en el cáliz (54 %) y distribución basal de antocianinas en el pedúnculo (54 %).

Grupo III. Flores de forma triangular (56 %). Dominó el grupo de colores naranja-rojo en la región principal exterior e interior (50 %) de los tépalos; el color se distribuyó en

patrón monocolor (69 %). Tépalos exteriores (50 %) y medios (81 %) de forma ovada ancha con ápices redondos (59 %) y porte horizontal, no presentaron ondulación en sus márgenes (50 %), solapamiento medio entre tépalos (56 %). Extremos superiores de pistilos y filamentos rojos (62 %) y anteras rojizas (56 %). Intensidad media del color verde en el cáliz (50 %). La coloración débil de antocianinas en cáliz (69 %) y pedicelo (56 %) y basal en el pedúnculo (50 %).

Aunque todas las accesiones analizadas son flores simples, hubo una amplia variación en los rasgos morfológicos evaluados; presentándose los diferentes estados de cada característica que describen: la coloración antociánica de hojas, del cáliz, del pedúnculo y del pedicelo; los grados de ondulación en márgenes y arrugas en la superficie de tépalos; la inclinación de tépalos, su forma y tipo de margen; los patrones de distribución de los colores, el solapamiento de tépalos, el color de las anteras y la forma frontal de la flor. Asimismo, el abanico de colores incluyó a los pertenecientes al grupo naranja-rojo, rojo, amarilla-verde, verde, rojo-morado, azul-verde y blanco como colores primarios o secundarios de las regiones internas y externas de los tépalos y de los estambres y pistilos.

Cabe destacar que los colores dominantes en tépalos y los patrones que describieron la distribución de los colores, fueron distintivos entre los tres grupos identificados. En el grupo I dominó el rojo y verde como colores principales de las zonas externa e interna y el blanco como color secundario de la región externa, en patrones flameados y veteados; en el grupo II destacaron el blanco y el verde como principales en la regiones externa e interna y el naranja-rojo en la región externa, distribuidos en patrones rayado y manchado y finalmente en el grupo III fueron más frecuentes los colores naranja-rojo en un patrón monocolor.

La variación fenotípica descrita en las 64 accesiones evaluadas fue mayor que la reportada por Azimi y Alavijeh (2020), quienes indicaron únicamente flores con forma frontal de estrella con colores que van desde el rojo, rosa, blanco y su combinación, aunque ellos incluyeron cultivares con flores simples y dobles.

En general, suelen ser frecuentes las tonalidades rojas y blancas en *Hippeastrum*; sin embargo, la combinación de sus diferentes intensidades y la integración de nuevos colores en las regiones internas y externas de tépalos, resultan en patrones novedosos y estéticamente atractivos que, sumados a la arquitectura de la flor, incrementan la popularidad del material (Meerow, 2014).

Se llevó a cabo una prueba de comparación de medias para doce rasgos cuantitativos evaluados dentro de las 64 accesiones de *Hippeastrum* y dentro de los tres grupos generados (Cuadro 6).

Los resultados muestran diferencias ($P \leq 0.01$) en seis de los rasgos evaluados (longitud y ancho de la flor, longitud del pedicelo, del pedúnculo y de la hoja) y diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en dos alturas frontales de la flor y ancho de la hoja. Por el contrario, los rasgos: ancho del pedúnculo cuyos valores oscilaron entre 1.57-1.72 cm, ancho del pedicelo que osciló entre 0.54-0.60, ancho de la cabeza estigmática de 0.45-0.51 cm y el número de flores por inflorescencia que varió entre 2.75-3.31 no fueron diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Comparación de medias por rasgo entre los tres grupos identificados a través del análisis de agrupamiento.

| Grupo | LMP** | AF* | AMF** | LPe** | LP** | AH* | LH** | LE** |
|-------|----------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| I | 11.50 b | 12.69 b | 13.07 b | 3.02 a | 39.81 b | 2.95 b | 27.50 b | 0.58 a |
| II | 11.72 ab | 12.69 b | 13.08 b | 2.28 b | 35.39 c | 3.06 b | 29.34 b | 0.55 a |
| III | 12 a | 13.38 a | 14.19 a | 3.18 a | 44.33 a | 3.62 a | 34.83 a | 0.45 b |
| C.V | 1.13 | 2.07 | 0.79 | 4.78 | 1.62 | 6.04 | 2.31 | 2.45 |
| DMSH | 0.49 | 0.68 | 0.39 | 0.49 | 2.36 | 0.49 | 2.59 | 0.047 |
| Media | 11.74 | 12.92 | 13.45 | 2.92 | 39.84 | 3.21 | 30.56 | 0.53 |

LMP: longitud máxima del perianto, AF: altura frontal, AM: ancho máximo de la flor, LPe: longitud del pedicelo, LP: longitud del pedúnculo, AH: ancho de la hoja, LH: longitud de la hoja, LE: longitud del estigma. Valores con igual letra en las columnas son iguales siguiendo la prueba de Tukey $P \leq 0.05$ (*) y $P \leq 0.01$ (**). DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. CV.: Coeficiente de variación.

Las accesiones del grupo III se distinguieron por presentar los valores más elevados en los tres rasgos florales longitud (12 cm), ancho (14.19 cm) y altura (13.38) de la flor, la longitud del pedúnculo (44.33 cm), longitud del pedicelo (3.18 cm), el ancho (3.62 cm) y la longitud de la hoja (34.83 cm); siendo significativamente diferentes y mayores a las medias de los grupos I y II (Cuadro 6).

Por el contrario, el grupo I presentó la menor media en las características florales, longitud máxima (11.50 cm), ancho (12.69 cm) y altura (13.07 cm) del perianto, pero estadísticamente éstas fueron similares a las del grupo II. En consecuencia, en el grupo II las dimensiones de los rasgos florales (ancho, altura y longitud de la flor) oscilaron entre los rangos dados por los grupos I y III.

De acuerdo con los rasgos fenotípicos de determinación para la clasificación de *Hippeastrum* indicados por Moerman, Bodegem y Van Scheepen (2007) y Van Scheepen, Moerman y Bodegom (2007), el ancho de las flores juega un papel importante. En los tres grupos identificados, las medias de la anchura máxima del perianto fueron mayores a los 12 cm pero menores a los 16 cm, y los tépalos tuvieron forma ovada o elíptica. Estos rasgos coinciden con los que presentan los cultivares Diamond y Butterfly.

Dentro de las especies ornamentales el tamaño de la flor es uno de los rasgos más importantes (Buta et al., 2013). En *Hippeastrum* se ha buscado que éste supere los 16 cm de ancho como la variedad Galaxy. Sin embargo, las flores miniatura también generan interés en el mercado, representadas por genotipos con anchos menores a 12 cm correspondientes al grupo colibrí (Moerman et al., 2007; Van Scheepen et al., 2007). De tal modo que las accesiones ubicadas en el grupo I del presente estudio, podrían ubicarse dentro del grupo colibrí al registrar valores menores a los 12 cm, mientras que las accesiones con tamaños superiores a los 16 cm se localizaron en los grupos II y III, las cuales podrían clasificarse dentro de los grupos Galaxy y Butterfly (Moerman et al., 2007; Van Scheepen et al., 2007).

Bajo estas circunstancias, las accesiones evaluadas podrían seleccionarse en dos sentidos, flores de diámetros menores a 12 cm como A37, A25 y A26 localizadas en los grupos I y II, así como accesiones con mayor dimensión como A24, A9 y A30 del grupo III.

Otros rasgos deseables en *Hippeastrum* son pedúnculos florales largos y no delgados, pues influyen en la resistencia y manejo durante su transporte, tanto para flores de corte como de maceta (Azimi & Alavijeh, 2020). Este rasgo fue el único estadísticamente diferente entre los tres grupos, la media más elevada corresponde al grupo I (44.33 cm) y la menor al grupo II (35.39 cm), valores ubicados dentro del rango de 27 a 70 cm encontrado en otros trabajos (Nascimento et al., 2011; Azimi & Alavijeh, 2020).

Comparado con Azimi y Alavijeh (2020) quienes encontraron de 3.33 a 5.33 flores por pedúnculo y Meerow (2014) que indicaron de 3.3 a 4.3 flores, en el presente trabajo en los tres grupos se registraron de 2.71 a 3.31 flores por pedúnculo, rango inferior al indicado por los autores antes mencionados. Sin embargo, al interior de los grupos se pueden seleccionar aquellos genotipos con seis o cinco flores por inflorescencia como las accesiones A7, A6 y A44, pertenecientes a los grupos I y III; pues esta característica es otro de los objetivos del mejoramiento, ya que independientemente del tamaño de la flor, suelen preferirse más flores por pedúnculo (Marasek-Ciolakowska, Sochacki & Marciniak, 2021).

En el presente trabajo la longitud de la hoja presentó diferencias altamente significativas entre grupos, siendo de 34.83 cm en el grupo III contra los 27.50 cm y 29.34 cm de los grupos I y II, respectivamente. Trabajos previos han reportado tamaños de 11 cm a 80 cm (Nascimento et al., 2011; Rees, 2012; Buta et al., 2013; Azimi & Alavijeh, 2020).

Las medias de la longitud de los pedicelos y la longitud de la cabeza estigmática presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los grupos I y III (3.02 a 3.18 cm) contra el grupo II (2.28 cm) y entre los grupos I y II (0.58 y 0.55 cm) contra el III (0.45 cm). Aunque no se mencionan dimensiones preferidas para estos rasgos morfológicos,

sus valores están dentro de los rangos mencionados por otros autores y de acuerdo con las directrices de la UPOV (2021) las dimensiones de las cabezas estigmáticas de algunas accesiones al interior del grupo III que alcanzaron los 2 cm y pedicelos en el grupo III de 8 cm, podrían clasificarse como grandes.

El mejoramiento genético requiere la planificación de los programas, formar colecciones, caracterizar el material, clasificarlo y conocer las demandas en el mercado para usar convenientemente la variabilidad genética disponible y acelerar la selección de genotipos (Tombolato, Dutilh, Barbosa, Veiga & Lucon, 2007).

4. 3 Cruzamiento entre grupos

Los resultados obtenidos a partir de los dendrogramas de los marcadores moleculares y los descriptores morfológicos fueron comparados entre sí con un análisis de cuadros de frecuencia de tabulación cruzada combinándolos entre ellos. Considerando las coincidencias de accesiones entre ambos dendrogramas, se formaron un total de siete grupos, tres por la intersección de los grupos I y II del dendrograma molecular con los tres grupos del dendrograma morfológico y sólo un grupo por la coincidencia del grupo III del dendrograma molecular con el grupo I del morfológico (Cuadro 7).

Cuadro 7. Organización de las accesiones de amarilis, resultado del cruzamiento entre los dendrogramas obtenidos de la caracterización molecular y morfológica.

| | | Caracterización morfológica | | |
|---------------------------|-----|--|--|--|
| | | Grupos | I | II |
| Caracterización molecular | I | A31, A28, A25, A20, A18, A23, A26, A1, A32, A27, A22, A37, A44, A17, A49, A11 A57, A55, A54, A61, A36, A58, A64, A63, A29 | A21, A39, A50, A30, A24, A46, A5 A38, A48, A47, A60, A62, A3 | |
| | II | A42, A7, A34, A52, A56, A19, A2 A51 | A59, A16, A14, A13, A12 | A53, A41, A40, A35, A33, A45, A43, A15, A4, A6, A9 |
| | III | A8, A10 | 0 | 0 |

Las accesiones cuya ubicación coincidió en ambos dendrogramas están resaltadas en negritas.

Un total de 30 de las 64 accesiones coincidieron, representando una correspondencia del 46 %. Las características que comparten la mayoría de las accesiones agrupadas en los siete grupos formados fueron:

Grupo I * I: Forma frontal de estrella (72 %). Color principal verde en la región interior (68 %) y naranja-rojo al exterior (76 %) distribuidos en patrones veteados (40 %). Forma de tépalos laterales ovada (52 %) y elíptica estrecha de los inferiores (62 %) con ápices acuminados (52 %). Tépalos sin arrugas (60 %), sin incisiones (80 %) ni solapamiento entre tépalos (84 %). Color naranja-rojo en el extremo superior de pistilos y estambres (52 %). Coloración basal de antocianinas en el pedúnculo (52 %), intensidad fuerte de antocianinas en el cáliz (52 %) y débil en hojas (52 %) (Apéndice 1a).

Grupo I * II: Forma frontal triangular (63 %). Color principal verde en la región interna de los tépalos (50 %) y blanca en la externa (75 %), distribuidos en patrones flameados (75 %). Tépalos externos ovados anchos (50 %). Base de pistilos y estambres amarillo-verde (63 %) y extremo superior blanco (87 %) con anteras amarillas. Porte horizontal (50 %) de los tépalos con solapamiento medio (87 %), superficie fuertemente arrugada (63 %) y ondulación débil en los márgenes (50 %). Distribución basal de antocianinas en el pedúnculo (75 %) (Apéndice 1b).

Grupo I * III: Forma frontal redonda y de estrella (80 %). Color principal interior amarillo-verde (60 %), principal exterior naranja-rojo (60 %) y secundario exterior rojo (60 %), distribuidos en patrones flameados (60 %). Tépalos exteriores y medios ovados ancho (80 %) e inferiores ovados (60 %) con ápices redondos (60 %) de porte horizontal, fuertemente arrugados (60 %) y con márgenes débilmente ondulados (60 %). Color superior naranja-rojo en pistilos (80 %) y naranja en estambres (80 %) con anteras rojizas (50 %). Coloración débil de antocianinas en el cáliz (Apéndice 1c).

Grupo II * I: Forma frontal de estrella (71 %). Color principal interior verde (42 %) y principal exterior rojo (71 %) en patrones flameados (54 %). Forma elíptica estrecha de tépalos inferiores (71 %) con ápices agudos (54 %), superficie de tépalos fuertemente arrugada (86 %). Color rojo en la región superior de estambres y pistilos (42 %) con

anteras amarillas (54 %). Distribución de antocianinas en el pedúnculo en la zona media (72 %) (Apéndice 1d).

Grupo II * II: Color principal interior verde (80 %), secundario exterior blanco (80 %) y principal exterior rojo (60 %), distribuidos en patrones rayados y manchados (80 %). Forma ovada ancha de tépalos externos (80 %) y ovada de los laterales (60 %) con ápice acuminado (60 %) con solapamiento medio (60 %), incisiones poco profundas (60 %), arrugas en tépalos fuertemente notables (60 %) y ondulación media en márgenes (60 %). Base del pistilo amarilla-verde (60 %) y zona superior blanca con anteras amarillas (80 %). Fuerte intensidad de antocianinas en cáliz (60 %) (Apéndice 1e).

Grupo II * III: Forma frontal triangular (63 %). Color principal interior rojo-naranja (55 %) y exterior naranja-rojo y rojo (90 %) en patrones monocolor (82 %). Forma de tépalos laterales ovado ancho (72 %) con ápices redondos (54 %), de porte horizontal, ondulación débil y superficie medianamente arrugada (46 %). Color superior rojo en el pistilo y estambres (72 %) con anteras rojizas (72 %). Distribución basal de antocianinas en el pedúnculo (54 %) (Apéndice 1f).

Grupo III * I: Forma frontal de la flor de estrella. Color principal de la región exterior rojo y de la secundaria blanco, tépalos ligeramente inclinados con superficie débilmente arrugada. Color basal blanco en el pistilo y amarillo-verde en los estambres con anteras amarillas. Coloración de antocianinas fuerte en hojas y media en el cáliz (Apéndice 1g).

Los rasgos más fácilmente observables que diferenciaron a los siete grupos entre sí fueron los colores principales de las regiones internas y externas de los seis tépalos, los patrones en que los colores se distribuyeron y los colores de la zona basal y del extremo superior de los estambres y pistilos.

En los siete grupos formados también se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) a excepción del ancho del pedicelo que osciló entre 0.49 cm a 0.62 cm y el ancho del pedúnculo que varió entre 1.49 cm a 1.78 cm (Tukey, $P \leq 0.05$).

Los resultados muestran diferencias ($P \leq 0.01$) en seis de los rasgos evaluados (longitud y ancho de la flor, longitud del pedicelo, del pedúnculo y de la hoja) y diferencias

significativas ($P \leq 0.05$) en dos alturas frontales de la flor y ancho de la hoja. Por el contrario, los rasgos: ancho del pedúnculo cuyos valores oscilaron entre 1.57-1.72 cm, ancho del pedicelo que osciló entre 0.54-0.60, ancho de la cabeza estigmática de 0.45-0.51 cm y el número de flores por inflorescencia que varió entre 2.75-3.31 no fueron diferentes ($P \leq 0.05$).

Las medias más altas del ancho (14.68 cm y 14.50 cm) y longitud (12.03 cm y 12.19 cm) de la flor se incluyen en dos intersecciones, la primera entre el grupo II y III y la segunda entre II y I de la caracterización molecular y morfológica, respectivamente, no encontrándose diferencia significativa entre ambos grupos. Esto significa que la selección puede incluirse accesiones contenidas en los grupos IIML* IMF y IIML* IIIMF que alcanzaron los 18.5 cm de ancho (Cuadro 8). Este comportamiento coincide con la tendencia observada en la agrupación de la caracterización molecular, en la cual los anchos más grandes de las flores se incluyeron principalmente en el grupo II.

Si el objetivo del mejoramiento es la obtención de genotipos miniatura destacan el grupo IIIML * IMF que mostraron diferencias significativas y con las medias más bajas o IML* IMF y IML* IIIMF con medias de 12.76 y 12.81, respectivamente, que agruparon a accesiones con anchos de hasta 8 cm. En cualquier caso, este rasgo muestra ser útil como criterio de evaluación y selección, siendo fácilmente identificable y uno de los rasgos fenotípicos que más discriminan la variación fenotípica junto con la longitud y la altura de la flor (Azimi & Alavijeh, 2020).

Los valores más altos de la longitud del pedúnculo (43.64 cm a 44.46 cm) sin diferencia estadística, se presentaron en IIML* IMF, IIML* IIIMF y IIIML* IMF, los cuales fueron estadísticamente distintos a los demás grupos que presentaron las medias más pequeñas. Sobre las dimensiones de las hojas, las medias más grandes se presentaron en los grupos IML* IIIMF y IIIML* IMF, donde el ancho osciló de 3.64 cm a 3.62cm y la longitud varió entre 37.77 cm a 33.83 cm. Los valores más pequeños se encontraron en IIML* IIIMF con medias estadísticamente diferentes de 2.78 cm de ancho y 27.71 cm de largo. A su vez, en IIML* IMF junto con IIML* IIIMF correspondieron las dimensiones más grandes de la cabeza estigmática.

Cuadro 8. Comparación de medias de diez rasgos cuantitativos entre los grupos formados del cruzamiento de dendrogramas de accesiones de amarilis.

| Grupo | LMP | AF | AMF | LPe | LP |
|------------|-----------|----------|----------|----------|---------|
| IIIML*IMF | 11.17 c | 13.63 b | 10.8 d | 3.52 ab | 38.83 b |
| IIML*IIMF | 11.53 bc | 12.39 c | 13.55 b | 2.62 cd | 35.47 b |
| IIML*IMF | 12.19 a | 12.76 bc | 14.50 a | 3.17 abc | 43.64 a |
| IIML*IIIMF | 12.03 ab | 13.63 b | 14.68 a | 2.94 bc | 44.46 a |
| IML*IMF | 11.31 bc | 12.59 c | 12.81 c | 2.93 bc | 38.7 b |
| IML*IIMF | 11.83 abc | 12.87 bc | 12.76 c | 2.07 d | 35.32 b |
| IML*IIIMF | 11.94 abc | 14.57 a | 13.10 bc | 3.7 a | 44.07 a |
| C.V | 2.55 | 1.87 | 1.26 | 6.25 | 2.61 |
| DMSH | 0.83 | 0.87 | 0.58 | 0.66 | 3.66 |
| Media | 11.71 | 13.2 | 13.17 | 2.99 | 40.06 |
| Grupo | AH | LH | AE | LE | FI |
| IIIML*IMF | 3.6 ab | 33.83 b | 0.43 cd | 0.52 bc | 2.5 e |
| IIML*IIMF | 2.92 ab | 27.55 dc | 0.77 a | 0.61 b | 3 c |
| IIML*IMF | 2.78 b | 24.71 d | 0.68 ab | 0.80 a | 3 c |
| IIML*IIIMF | 2.63 b | 33.50 b | 0.54 bc | 0.43 c | 3 c |
| IML*IMF | 2.95 ab | 27.88 c | 0.37 d | 0.51 bc | 2.68 d |
| IML*IIMF | 3.14 ab | 29.88 c | 0.36 d | 0.51 bc | 3.5 a |
| IML*IIIMF | 3.62 a | 37.77 a | 0.45 cd | 0.49 c | 3.2 b |
| C.V | 6.75 | 2.66 | 8.85 | 6.03 | 0 |
| DMSH | 0.77 | 2.88 | 0.16 | 0.12 | 0 |
| Media | 2.23 | 30.73 | 0.51 | 0.55 | 2.98 |

LMP: longitud máxima del perianto, AF: altura frontal, AM: ancho máximo de la flor, LPe: longitud del pedicelo, LP: longitud del pedúnculo, AH: ancho de la hoja, LH: longitud de la hoja, AE: ancho del estigma, LE: longitud del estigma; FI: flores por inflorescencia. Valores con igual letra en las columnas son iguales siguiendo la prueba de $P \leq 0.01$. DMSH: Diferencia mínima significativa honesta. C.V.: Coeficiente de variación. ML: molecular, MF: morfológico.

A pesar de la coincidencia de 30 accesiones entre los agrupamientos, el análisis de cruzamiento muestra que no existe un mismo patrón de asociación en la mayoría de los rasgos morfológicos con el conjunto de datos moleculares. Por lo que las distancias obtenidas del análisis de los descriptores morfológicos no están directamente relacionadas con las similitudes obtenidas de la caracterización molecular. Ambos análisis dan información complementaria sobre la variabilidad genética presente en la colección que puede usarse para la selección de accesiones con mayor potencial para incluir en los programas de mejoramiento genético.

Este análisis facilita la identificación de rasgos morfológicos más frecuentes al interior de los nuevos grupos que por sí sólo el análisis molecular no mostró. Y al mismo tiempo, la clasificación de las accesiones fue más detallada y describe las relaciones genéticas basada en las distancias de disimilitud.

Ambas caracterizaciones son indispensables para iniciar los programas de mejoramiento, permitiendo conocer la variabilidad del material y seleccionar aquellas accesiones con mayor potencial y particularmente la caracterización morfológica posibilita evaluar la calidad del material (Azim, Jozghasemi & Barba-Gonzalez, 2018). Además, la caracterización de accesiones de reciente adquisición resulta de gran utilidad para dirigir el trabajo antes de intensificar esfuerzos en proyectos de mejoramiento enfocándose a los intereses y demandas del consumidor (Franco & Hidalgo, 2003; Widrlechner, 2010; Caruso, Broglia & Pocovi, 2018).

V. CONCLUSIONES

Caracterización molecular

Los marcadores ISSR son herramientas eficientes y útiles para describir la variabilidad y el polimorfismo de *Hippeastrum*.

El porcentaje de bandas polimórficas de 88.02 % y las distancias genéticas estimadas entre 0.30-0.82 demostraron la alta variabilidad genética de las accesiones.

Caracterización morfológica

Todos los rasgos morfológicos evaluados fueron polimórficos y el agrupamiento explicó el 72 % de la variabilidad fenotípica total.

Cinco componentes principales explicaron el 70 % de la variación morfológica; los rasgos florales longitud máxima, altura frontal y anchura máxima del perianto contribuyen en mayor medida a la variabilidad observada.

Correspondencia entre caracterizaciones

La coincidencia del 46 % entre los dos dendrogramas demuestra la complementación entre ambas caracterizaciones.

VI. LITERATURA CITADA

- Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares, In L. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds.) *Ecología Molecular* (pp: 541-566). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Al Shammari, L., Hulcová, D., Maříková, J., Kučera, T., Šafratová, M., Nováková, L., Schmidtf, M., Pulkrábková, L., Janoušek, J., Soukup, O., Kuneš, J., Opleta, L., & Cahlíková, L. (2021). Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany*, 136, 137-146.
- Aneja, B., Yadav, N. R., Chawla, V., & Yadav, R. C. (2012). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular breeding*, 30(4), 1635-1648.
- Azimi, M. H. & Alavijeh, M. K. (2020). Morphological traits and genetic parameters of *Hippeastrum hybridum*. *Ornamental Horticulture*, 26(4), 579-590.
- Azimi, M. H., Jozghasemi, S., & Barba-Gonzalez, R. (2018). Multivariate analysis of morphological characteristics in *Iris germanica* hybrids. *Euphytica*, 214(9), 1-11.
- Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281.
- Bell, W. D. (1973). New potentials in amaryllis breeding. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 86, 462-466.
- Benschop, M., Kamenetsky, R., Le Nard, M., Okubo, H., & De Hertogh, A. (2010). 1 The global flower bulb industry: Production, utilization, research. *Horticultural reviews*, 36(1), 1-115.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314.
- Büneker, H. M., & Bastianabral, R. E. (2017). Taxonomic novelties in south brazilian amaryllidaceae-I: *Hippeastrum ramboi* new species from Rio Grande do sul and lectotypification of *H. Breviflorum* herb. *Balduinia*, 60, 1-10.

- Buta, E., Cantor, M., Buta, M., & Horț, D. (2013). Studies on the growth and development of some *Hippeastrum* varieties. *Seria Horticultură*, 56(1), 227-232.
- Byamukama, R., Jordheim, M., Kiremire, B., Namukobe, J., & Andersen, Ø. M. (2006). Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars. *Scientia Horticulturae*, 109(3), 262-266.
- Cabrita, P. (2022). Non-invasive assessment of the physiological role of leaf aerenchyma in *Hippeastrum* Herb. and its relation to plant water status. *Planta*, 256(1), 1-14.
- Caruso, G., Broglia, V., & Pocovi, M. (2018). Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal. *Lhawet*, 4(1), 45-50
- CBI Market Intelligence. (2016) CBI Trade Statistics: Cut Flowers and Foliage; CBI Market Intelligence and Ministry of Foreign Affairs, The Netherlands. p. 12.
- Chakrabarty, D., Gupta, V. N. & Datta, S. K. (2007). Varietal identification and assessment of genetic relationships in *Hippeastrum* using RAPD markers. *Plant Biotechnology Reports*, 1(4), 211-217.
- Colin Nuñez, C. A. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1): 1-6
- Datta, S.K. (2021). Amaryllis/*Hippeastrum*, In S.K. Datta, & Y.C. Gupta (Eds) *Floriculture and Ornamental Plants. Handbooks of Crop Diversity: Conservation and Use of Plant Genetic Resources* (pp. 701-727). Editions Springer.
- De Riek, J., & Debener, T. (2009, agosto). Present use of molecular markers in ornamental breeding. In J.M. van Tuyl, & D.P. de Vries (Eds.) *XXIII International Eucarpia Symposium (Section Ornamentals) on Colourful Breeding and Genetics- Part II* (pp. 77-83). Acta Horticulturae.
- Doorduyn, J.C., Verkerke, W. (2002). Effects of bulb temperature on development of *Hippeastrum*. *Acta Horticulturae*, 570, 313–318.
- Doré, C., & Varoquaux, F. (2006). *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées* Editions Quae. 790 p.

- Franco, T. L. & Hidalgo, R. (2003). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. (Boletín Técnico No. 8). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 89 p.
- Fishchuk, O. (2021). Comparative flower morphology in *Hippeastrum striatum* (Lam.) HE Moore. (Amaryllidaceae). *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(1), 273-278.
- González, A., & Aguirre, X. (2007) Inter Simple Sequences Repeat, In L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.) *Ecología Molecular* (pp. 541-566). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Hennipman, E. (1999, mayo). Sustainable exploitation in ornamental horticulture, an example: *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). In E. Maloupa (Eds.). *IV International Symposium on New Floricultural Crops* (pp. 67-73). Acta Horticulturae.
- Hernández, A.E. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista BioCiencias*, 2(3), 113-118.
- Hoa, N., Hương, B., Tường, H., & Sơn, L. (2014). Đánh giá đa dạng di truyền một số dòng, giống hoa chi Lan Huệ (*Hippeastrum* herb.) bằng chỉ thị phân tử RAPD. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 30(1), 1-8.
- Idrees, M., & Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European Academic Research*, 2(1), 1513-1540.
- Inkham, C., Panjama, K., & Ruamrungsri, S. (2022). Irrigation Levels and Fertilization Rates as Pre-Harvest Factors Affecting the Growth and Quality of *Hippeastrum*. *Horticulturae*, 8(4), 345.
- Jamil, M., Rahman, M., & Rahman, M. (2014). Effect of bulb cutting and pot medium on propagation of hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* Hort.). *Journal of Ornamental Plants*, 4(3), 123-132.
- Johnson, D. E. (1998). *Métodos multivariados aplicados al análisis de datos*. International Thomson Editores. 566 p.
- Kamenetsky, R., & Okubo, H. (2012). Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production. CRC press. 560 p.
- Kuligowska, K., Lütken, H., & Müller, R. (2016). Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*, 244(1), 1-17.

- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(2), 277–292.
- Liang, Y., Ran, S. F., Bhat, J., Hyde, K. D., Wang, Y., & Zhao, D. G. (2018). *Curvularia microspora* sp. nov. associated with leaf diseases of *Hippeastrum striatum* in China. *MycKeys*, 29, 49-61.
- Liu, M. C., & Yeh, D. M. (2015). 'TSS No. 1-Pink Pearl': A Double-Flowered and Fragrant Amaryllis Cultivar. *HortScience*, 50(10), 1588-1590.
- Loo, J. A., (2011). Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. *Comisión Nacional Forestal de México*. 192 p.
- Marasek-Ciolakowska, A., Sochacki, D., & Marciniak, P. (2021). Breeding aspects of selected ornamental bulbous crops. *Agronomy*, 11(9), 1709.
- Masuelli, R. (1999). Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. *Avances en Horticultura*, 4(1), 54-66.
- Meerow, A. W. (1988). New Trends in Amaryllis (*Hippeastrum*) Breeding. In Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 101, 285-287.
- Meerow, A. W. (2000). Rio 'PPAF, Sampa 'PPAF, and Bahia 'PPAF, three new triploid amaryllis cultivars. *HortScience*, 35(1), 147-149.
- Meerow, A. W., & Snijman D. A. (1998). Amaryllidaceae. In K. Kubitzki, H. Huber, P. Rudall, P.S. Stevens, & T. Studzel (Eds.) The families and genera of vascular plants III. Flowering plants: Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae) (pp. 83–110) Springer.
- Meerow, A. W., Broschat, T. K., & Kane, M. E. (1990). Breeding of new *Hippeastrum* cultivars using diploid species: the F-1 evaluation. *Hortscience*, 25(9), 1142e-1142.
- Meerow, A. W. (2009). Tilting at windmills: 20 years of *Hippeastrum* breeding. *Israel Journal of Plant Sciences*, 57(4), 303-313.
- Meerow, A. W. (2014). The Florida Series of Hybrid Amaryllis: Five New *Hippeastrum* Cultivars. *Hortscience*, 49(8), 1102-1107.
- Moerman, A., Bodegem, S., Van Scheepen, J. (2007) Nieuwe cultivargroepen voor *Hippeastrum*cultivars. (Folleto Num. 111). *BloembollenVisie*. 4 p.

- Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19-35.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoglu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Ozkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- Nascimento, N. F. F., Nascimento, M. F., Santos, R. M. C., Rêgo, E. R., Silva Neto, J., Rêgo, M., Buckner, C., & Finger, F. L. (2011, November). Genetic variability of bulbs and flowers traits in *Hippeastrum puniceum*. In G. Facciuto, & M.I. Sánchez (Eds.). *VII International Symposium on New Floricultural Crops*. (pp. 147-152). Acta Horticulturae.
- Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers are we doing it right. *ASM Science Journal*, 9(1), 30-39.
- Núñez-Colín, C. A., & Barrientos-Priego, A. F. (2006). Estimación de la variabilidad interna de muestras poblacionales, mediante análisis de componentes principales. *Interciencia*, 31(11), 817-821.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.
- Phuong, P. T. M., Isshiki, S., & Miyajima, I. (2014). Genetic variation of *Hippeastrum* accessions in Vietnam. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 59(2), 235–241.
- Ramírez Hernández, J. J. & Avitia-Rodríguez, J. A. (2017). Floricultura mexicana en el siglo XXI: su desempeño en los mercados internacionales. *Revista de Economía*, 34(88), 99-122.
- Raj, S. K., Snehi, S. K., Kumar, S., & Khan, M. S. (2009). First molecular detection and identification of a potyvirus associated with severe mosaic disease of amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 50-53.

- Rees, A. (2012). *The growth of bulbs: Applied aspects of the physiology of ornamental bulbous crop plant*. Editorial Academic Press. 300 p.
- Robarts, D. W., & Wolfe, A. D. (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences*, 2(7), 1-13.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (2018). Floricultura, cultivando belleza y ganancias. [Data set] <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/floricultura-cultivando-belleza-y-ganancias>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (2020). Lista, producción nacional de flores para los festejos del Día de la Madre. [Data set]. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/lista-produccion-nacional-de-flores-para-los-festejos-del-dia-de-la-madre>
- SAS, I. (2014). *Sas/stat r 13.2 users guide*. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc. 2006-2089.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Cierre de la producción agrícola por estado. [Data set] <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Cierre de la producción agrícola por cultivo. [Data set] <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (2022, septiembre) Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. [Data set] <https://datastudio.google.com/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58>
- Seabrook, J. E., & Cumming, B. G. (1977). The in vitro propagation of *Amaryllis* (*Hippeastrum* spp. hybrids). *In Vitro*, 13(12), 831-836.
- Shi, Z., Zheng, Q., Sun, X., Xie, F., Zhao, J., Zhang, G., Zhao, W., Guo, Z., Ariunzo, A., Fahad, S., Adman, M., Qin, D., Saud, S., & Yajun, C. (2020). Assessment of differences in morphological and physiological leaf lodging characteristics between two cultivars of *Hippeastrum rutilum*. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-13.

- Silberbush, M., Ephrath, J. E., Alekperov, C., & Ben-Asher, J. (2003). Nitrogen and potassium fertilization interactions with carbon dioxide enrichment in *Hippeastrum* bulb growth. *Scientia Horticulturae*, 98(1), 85-90.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741.
- Swarup, S., Cargill, E. J., Crosby, K., Flagel, L., Kniskern, J., & Glenn, K. C. (2021). Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. *Crop Science*, 61(2), 839-852.
- Tejeda-Sartorius, O., Ríos-Barreto, Y., Trejo-Téllez, L. I., & Vaquera-Huerta, H. (2015). Caracterización de la producción y comercialización de flor de corte en Texcoco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 1105-1118.
- Tombolato, A., & Matthes, L. (1996, October). Collection of *Hippeastrum* spp., *Alstroemeria* spp. and other Brazilian bulbous species. In J.A. Considine, & J. Gibbs (Eds.) *III International Symposium on New Floricultural Crops* (pp. 91-98). *Acta Horticulturae*.
- Tombolato, A. F. C., Dutilh, J. H. A., Barbosa, W., Veiga, R. F. A., & Lucon, T. N. (2007, 16-20 abril). *Brazilian descriptor for Hippeastrum hybrids. Building a sustainable future: the role of botanic gardens* [Conferencia]. 3rd Global Botanic Gardens Congress, Wuhan, China.
- UPOV. (2001) Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity, and stability amaryllis (*Hippeastrum* Herb.). Geneva: International Union for the Protection of New Varieties of Plant TG/181/3, 17 p.
- UPOV (2021) Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity, and stability amaryllis (*Hippeastrum* Herb.). Geneva: International Union for The Protection of New Varieties of Plant TG/181/4, 30 p.
- Van Scheepen, J., Moerman, A. & Bodegom, S. (2007) *Hippeastrum* cultivars zoals die in teelt en handel zijn. *Bloembollensie*, 125, 29–30.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN, In A. Cornejo, B. Rendón, A. Serrato, & M. Rocha (Comps.),

Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (pp. 1-25). Secretaría del Medio ambiente y Recursos Naturales.

WFO (2022, septiembre): World Flora Online. [Data set] <http://www.worldfloraonline.org/>

Widrechner, M. P. (2010). Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13(13), 11-17.

Wang, Y., Chen, D., He, X., Shen, J., Xiong, M., Wang, X. & Wei, Z. (2018). Revealing the complex genetic structure of cultivated amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) using transcriptome-derived microsatellite markers. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.

Xiong, M., Wang, Y., Chen, D., Wang, X., Zhou, D. & Wei, Z. (2020). Assessment of genetic diversity and identification of core germplasm in single-flowered amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) using SRAP markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 966-974

Xiong, M., Yang, S., Wang, Y., Chen, D., Wang, X., Zhou, D., & Wei, Z. (2021). Genetic analysis of 38 double-flowered amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) cultivars based on SRAP markers. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 20(3), 15-25.

Zhang, L., Xu, Y., Cheng, H., Zhou, Y., & Lou, X. (2012). Genetic relationship analysis and fingerprint construction of 62 cultivars of *Hippeastrum* spp. based on ISSR marker. *Journal of Plant Resources and Environment*, 21(4), 48-54.

APÉNDICE

Apéndice 1a. Accesiones que integran al grupo I*1



Apéndice 1a. Accesiones que integran al grupo I*I (continuación).



Apéndice 1b. Accesiones que integran al grupo I*II



Apéndice 1c. Accesiones que integran al grupo I*III.



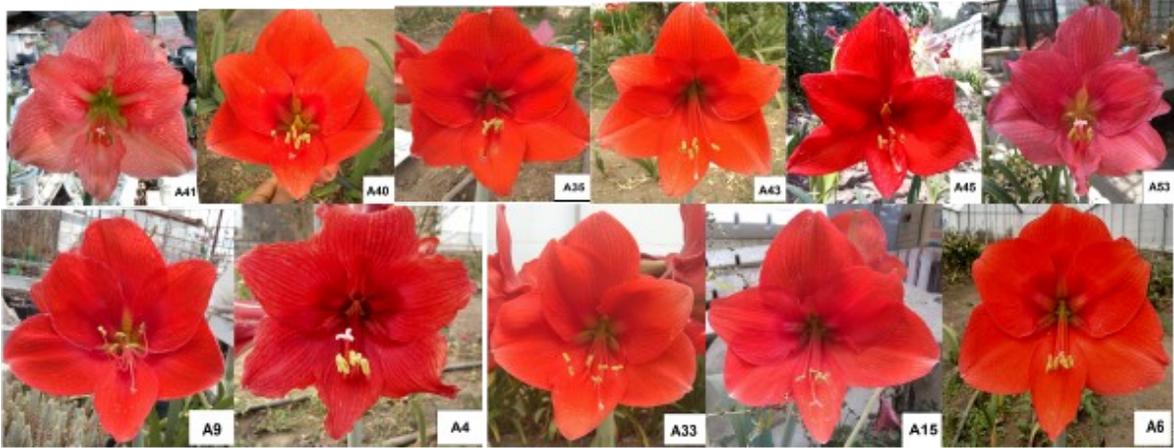
Apéndice 1d. Accesiones que integran al grupo II*I.



Apéndice 1e. Accesiones que integran al grupo II*II



Apéndice 1f. Accesiones que integran al grupo II*III



Apéndice 1g. Accesiones que integran al grupo III*I



