



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO
MESTRÍA EN CIENCIA EN HORTICULTURA**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE
NUEVAS VARIEDADES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* L.
Spreng)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

PRESENTA:

Amparo Martínez Hernández

Bajo la supervisión de:

Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo



Chapingo, Estado de México. Mayo de 2022

Instituto de Horticultura

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE
NUEVAS VARIEDADES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia
aethiopica* L. Spreng)**

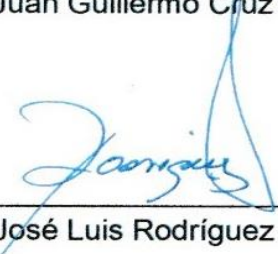
Tesis realizada por Amparo Martínez Hernández bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____


Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo

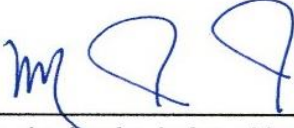
ASESOR: _____


Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: _____


Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESORA: _____


Dra. Ma. de Jesús Juárez Hernández

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
AGRADECIMIENTOS	XIII
DEDICATORIAS.....	XIV
RESUMEN GENERAL.....	15
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	17
Objetivo general.....	18
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
2.1 Situación mundial y nacional de la producción de alcatraz	19
2.2 . Descripción general del alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng)	20
2.3 Organismos fitopatológicos del género <i>Zantedeschia</i>	21
2.3.1 Bacterias	21
2.3.2 Hongos	22
2.3.3 Virus.....	22
2.4 Métodos de diagnóstico biológicos y moleculares.....	24
2.5 Métodos de control y erradicación.....	25
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	26
2.7 Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	26
2.7.1 Etapa 0:	26
2.7.2. Etapa I	26
2.8. Respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> de plantas	31
2.8.1 Organogénesis directa.....	31
2.9. Cultivo de células en suspensión o en medios líquidos.....	37

2.9.1 Otras aplicaciones de las técnicas <i>in vitro</i>	38
2.9.2. Cultivo de embriones cigóticos o germinación <i>in vitro</i>	38
2.9.3 Floración <i>in vitro</i>	39
Conclusiones	40
2.9.4 Literatura citada	41
3. CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS DE ALCATRAZ (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	47
CONTROL OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN CALLA LILY (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) TISSUE CULTURE.....	48
ABSTRACT.....	48
Key words: <i>Zantedeschia</i> , soft rot, Deja vú, Utopía	48
3.1 Introducción	49
3.2 Materiales y métodos.....	50
3.2.1 Ubicación de la fase experimental.....	50
3.2.2. Material vegetal.....	50
3.2.4. Etapa 0: Manejo de la planta donante.....	51
3.2.5. Etapa 1: Estrategias de control de microorganismos fitopatógenos en el establecimiento.....	52
3.3. Establecimiento aséptico.....	53
3.3.1. Bioensayo 1.....	53
3.3.2. Bioensayo 2	54
3.3.3. Bioensayo 3	55
3.3.4. Bioensayo 4	56
3.3.5. Bioensayo 5	57
3.3.6. Bioensayo 6	58
3.3.7. Bioensayo 7	58

3.3.8. Bioensayo 8	59
3.3.9. Bioensayo 9	62
3.4. Resultados y discusión.....	65
3.4.1. Diagnóstico fitosanitario	65
3.4.2. Establecimiento aséptico	67
Ensayo 8	70
Experimento 9	73
3.5. Conclusiones	77
Literatura citada	78
4. GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE SEMILLAS DE ALCATRAZ (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. SPRENG).....	81
RESUMEN.....	81
<i>In vitro</i> GERMINATION SEEDS OF CALLA LILY (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. SPRENG)	82
Abstract.....	82
4.1. Introducción	83
4.2. Materiales y métodos.....	84
4.2.1. Material vegetal	84
4.2.2. Ubicación del experimento.....	86
4.2.3. Imbibición de la semilla.....	86
4.2.4. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio	86
4.2.5. Establecimiento en cámara de germinación	86
4.2.6. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng	87
4.2.6.1. Establecimiento aséptico	87
4.2.6.2. Diseño experimental.....	88

4.2.7. Establecimiento de ensayo de germinación en invernadero.....	90
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
4.3.1. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio	91
4.3.2. Germinación <i>in vitro</i> de semillas	93
4.4. Conclusiones.....	95
4.5. Literatura citada.....	96
5. RESCATE Y CULTIVO <i>in vitro</i> DE EMBRIONES DE ALCATRAZ (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	98
RESUMEN.....	98
RESCUE AND CULTURE OF CALLA LILY (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) EMBRYOS.....	99
ABSTRACT.....	99
5.1 Introducción	100
5.2 Materiales y métodos.....	101
5.2.1 Medio de cultivo.....	102
5.3. Diseño experimental	103
5.4 Resultados y discusión	105
5.5 Conclusiones.....	108
5.6 Literatura citada.....	108

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de las estrategias aplicadas en la etapa de establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> spp)	29
Cuadro 2. Resumen de las investigaciones relativas a la organogénesis directa de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> spp)	32
Cuadro 3. Resumen de las investigaciones sobre la organogénesis indirecta de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> spp).....	35
Cuadro 4. Resumen de las investigaciones relativas a la embriogénesis somática de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> spp)	37
Cuadro 5. Resumen de las investigaciones relativas a la floración <i>in vitro</i> de alcatraz (<i>Zantedeschia</i> spp).....	40
Cuadro 6. Programa de manejo fitosanitario en plantas de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) previo al cultivo de tejidos.....	51
Cuadro 7. Tratamientos aplicados en el octavo bioensayo de control de patógenos en el establecimiento de <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	60
Cuadro 8. Tratamientos aplicados en el noveno bioensayo de control de patógenos en el establecimiento de <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	63
Cuadro 9. Resultados de diagnóstico fitosanitario para la detección de hongos, bacterias y virus en cuatro selecciones de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng)	66
Cuadro 10. Efecto de los tratamientos sobre la tasa de contaminación en el establecimiento <i>in vitro</i> de los cultivares Deja vú y Utopía pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng	71
Cuadro 11. Efecto de los tratamientos sobre la tasa de contaminación en el establecimiento <i>in vitro</i> de yemas adventicias de los cultivares Deja vú y Utopía pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	74
Cuadro 12. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido giberélico (AG ₃) empleados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng)	88

Cuadro 13. Tratamientos utilizados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	89
Cuadro 14. Tratamientos utilizados en la germinación de semillas de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) en sustrato con peat moss y agrolita (1:1)	91
Cuadro 15. Porcentajes de viabilidad para cuatro grupos de semilla de alcatraz blanco (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) tratados con cloruro de tetrazolio al 1%.....	92
Cuadro 16. Efecto de los reguladores del crecimiento en la emergencia y tiempo medio de germinación de semillas provenientes de frutos inmaduros de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) tratadas con agua estéril.....	94
Cuadro 17. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido giberélico (AG ₃) empleados en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	102
Cuadro 18. Tratamientos utilizados en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	104
Cuadro 19. Prueba de Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y medidas de estadística descriptiva sobre la variable “Tasa de desarrollo de embriones” de blanco o criollo cultivados <i>in vitro</i> (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta madura perteneciente a alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) var. Utopía donde se aprecian: (a) hoja; (b) peciolo; (c) raíces; (d) rizoma; (e) yema apical; (f) yema adventicia; (g) espata inmadura. Fuente: elaboración propia.....	21
Figura 2. Esquema de desinfestación del primer bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	54
Figura 3. Esquema de desinfestación del segundo bioensayo para yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	55
Figura 4. Esquema de desinfestación del tercer bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	56
Figura 5. Esquema de desinfestación del cuarto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	56
Figura 6. Esquema de desinfestación del quinto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	57
Figura 7. Esquema de desinfestación del sexto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	58
Figura 8. Esquema de desinfestación del séptimo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	59
Figura 9. Esquema de desinfestación con Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	61

Figura 10. Esquema de desinfestación con agua caliente (40 °C) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).	62
Figura 11. Esquema de desinfestación con Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	62
Figura 12. Esquema de desinfestación con Plant Preservative Mixture® (PPM) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	64
Figura 13. Esquema de desinfestación con Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.....	65
Figura 14. Esquema de desinfestación con Nitrato de plata (80 mg L ⁻¹) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	65
Figura 15. Porcentaje de contaminación por hongos en muestras de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas incubadas en luz a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng	68
Figura 16. Porcentaje de contaminación por hongos en muestras de de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas incubadas en oscuridad a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo <i>in vitro</i> de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng).	68
Figura 17. Porcentaje de contaminación por bacterias en muestras de Rb(Región basal), Rt (Región terminal) y yemas (Y) incubadas en luz a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng.	69
Figura 18. Porcentaje de contaminación por bacterias en muestras de Rb(Región basal), Rt (Región terminal) y yemas (Y) incubadas en oscuridad a los 8	

días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. 70

Figura 19. Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en muestras de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas adventicias (Y) a los 11 días después del establecimiento para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de los cultivares Utopía y Deja vú..... 73

Figura 20. Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en muestras de yemas adventicias a los 8 días después del establecimiento para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de los cultivares Utopía y Deja vú..... 75

Figura 21. Presencia de hongos durante el establecimiento *in vitro* de explantes de alcatraz (*Z. aethiopica* L. Spreng). a) Colonia de hongos en tejido de la región medular basal; b-c) Desarrollo de micelo en yemas adventicias de rizoma; d) Desarrollo de micelio en región medular terminal..... 76

Figura 22. Presencia de bacterias durante el establecimiento *in vitro* de explantes de *Z. aethiopica* L. Spreng. a-c) Contaminación por bacterias en tejido medular de la región basal del rizoma; d-f) Contaminación por bacterias en yemas adventicias; g-i) Contaminación por bacterias en tejido de la región terminal del rizoma..... 76

Figura 23. Daños en tejidos de *Z. aethiopica* L. Spreng. a) Endurecimiento superficial en tejido de la región basal; b) Necrosis inicial en tejido de región terminal; c) Necrosis inicial en yema..... 77

Figura 24. Infrutescencia de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) en dos estados de maduración: a) Infrutescencia en desarrollo; b) Infrutescencia madura y con frutos completamente expandidos..... 85

Figura 25. Semillas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) provenientes de frutos en dos estados de maduración: a) Semilla de fruto inmaduro; b) Semilla de fruto maduro..... 85

Figura 26. Esquemas de desinfestación de semilla de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) previo al establecimiento *in vitro*..... 87

Figura 27. Semillas de alcatraz blanco o criollo (*Z. aethiopica* L. Spreng) sometidas a la prueba de cloruro de tetrazolio al 1%. a) Semillas de frutos

maduros tratadas con agua estéril; b) Semillas de frutos maduros tratadas con H ₂ O ₂ al 30%; c) Semillas de frutos inmaduros tratadas con agua estéril y d) semillas de frutos inmaduros tratadas con H ₂ O ₂ al 30%.....	92
Figura 28. Embriones de alcatraz blanco o criollo vistos con una lente portátil 400x (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) tratados con cloruro de tetrazolio al 1%. a) Embrión proveniente de semilla de fruto maduro tratada con H ₂ O ₂ al 30%; b) Embrión proveniente de semilla de fruto inmaduro tratado con agua estéril.	93
Figura 29. Emergencia de plántulas de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) a los 66 DDE; a-c) Desarrollo de la radícula y emergencia de la plúmula d) Elongación de la plúmula; e) Primera hoja	95
Figura 30. Secuencia de desarrollo de una plántula de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) obtenida a partir de semilla	95
Figura 31. Secuencia de localización, aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de embriones de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) proveniente de semilla de fruto maduro tratada con peróxido de hidrógeno al 30%: a-c) escisión de la semilla; d-e) exposición del embrión; e) extracción del embrión.	103
Figura 32. Porcentaje de germinación de embriones de alcatraz blanco o criollo (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) cultivados <i>in vitro</i>	107
Figura 33. Secuencia de desarrollo <i>in vitro</i> de un embrión aislado de semilla de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) proveniente de fruto inmaduro y embebida en agua estéril	107
Figura 34. Plántula de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> L. Spreng) obtenida mediante rescate de embriones. El embrión se extrajo de una semilla de fruto inmaduro embebida en agua estéril	108

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para la realización de mi maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por la oportunidad que me brindó para volver a sus aulas.

A mi comité asesor: Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo, Dr. José Luis Rodríguez de la O, Dr. José Oscar Mascorro Gallardo y Dra. Ma. de Jesús Juárez Hernández por su confianza y total disposición para la realización de este proyecto.

A la licenciada en Administración Pública Gisela García De La Rosa, técnico de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y al C. Mateo Barrientos del Laboratorio de semillas del Departamento de Fitotecnia, por su tiempo y conocimiento dedicado en este trabajo.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, profesor de la Universidad Nacional Autónoma de México por su asesoría en el manejo fitopatológico del material vegetal.

Al Ing. Mauricio Meneses López por su apoyo en el mantenimiento de la planta.

A María Mercedes Buendía Ruíz, alumna de la Universidad Autónoma Metropolitana, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

DEDICATORIAS

A mis padres, Patricia Hernández López y Daniel Martínez, que a pesar de las adversidades siempre me impulsaron a continuar estudiando.

A mis hermanos y próximos colegas Danna Paola Martínez Hernández y Eduardo Martínez Hernández, por su amor y comprensión.

A mi madrina, Obdulia Amparo Rodríguez, por su amor y apoyo incondicional.

RESUMEN GENERAL
PROPAGACIÓN *in vitro* DE
NUEVAS VARIEDADES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia*
***aethiopica* L. Spreng)**

Con la finalidad de generar plántulas de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) libres de enfermedades y generar un esquema de control de microorganismos patógenos, se estableció y evaluó la respuesta de los cultivares Deja vú y Utopía así como de semillas y embriones de alcatraz blanco o criollo. Los resultados mostraron que el antibiótico agrimycin (2 g L^{-1}) adicionado con el fungicida benomilo (2 g L^{-1}) reducen significativamente la contaminación endófitas por hongos y bacterias ($P \leq 0.05$) en explantes provenientes de rizoma para los cultivares Deja vú y Utopía. Mientras que en la germinación de semillas *in vitro* no se observó contaminación con el uso de etanol al 70 % durante 1 minuto seguido de hipoclorito de sodio al 10 % durante 15 minutos y con el uso de peróxido al 30 %. En el establecimiento *in vitro* de semillas y embriones las semillas se extrajeron de dos diferentes estados de maduración (maduro e inmaduro), se pretrataron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % y únicamente con agua estéril, posteriormente se sembraron en un medio de cultivo con sales Murashige & Skoog (MS) al 100 % adicionado con BAP (0, 0.3 y 3 mg L^{-1}) y AG_3 (0, 0.3 y 3 mg L^{-1}), la prueba Kruskal y Wallis demostró que el medio suplementado con 3.0 mg L^{-1} de AG_3 y 0.3 mg L^{-1} de BAP presentó el menor tiempo medio de germinación (35 días después del establecimiento) por otra parte, no se observó efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de emergencia ($P \leq 0.05$) mientras que en el rescate de embriones no se observó efectos significativos de los tratamientos probados.

Palabras clave: *Calla lily*, micropropagación, *Pectobacterium*, semilla, rescate de embriones.

GENERAL ABSTRACT

***In vitro* PROPAGATION OF NEW CALLA LILY CULTIVARS (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)**

In order to generate disease-free calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) seedlings and to generate a control procedure for pathogenic microorganisms based on phytosanitary detection and diagnosis, the response of the cultivars "Deja vu" and "Utopia" as well as seeds and embryos of white or wild calla lily was established and evaluated. The results showed that the antibiotic Agrimycin (2 g L^{-1}) added with the fungicide Benomyl (2 g L^{-1}) reduced the significantly endophytic contamination by fungi and bacteria ($p \leq 0.05$) in explants from rhizome for the cultivars Deja vú and Utopia. While for *in vitro* seed germination, no contamination was observed with the use of 70% ethanol for 1 minute followed by 10% sodium hypochlorite for 15 minutes and with the use of 30% peroxide. For the *in vitro* establishment of seeds and embryos, seeds were extracted from two different stages of maturity (mature and immature), pretreated with 30% hydrogen peroxide and sterile water only, then sown in a culture medium with 100% Murashige & Skoog (MS) salts added with BAP ($0, 0, 0.3$ and 3 mg L^{-1}) and GA₃ ($0, 0.3$ and 3 mg L^{-1}), the Kruskal and Wallis test showed that the medium supplemented with 3.0 mg L^{-1} of AG₃ and 0.3 mg L^{-1} presented the lowest mean germination time (35 days after establishment) on the other hand, no effect of the treatments on the percentage of emergence was observed ($p \leq 0.05$) while in the rescue and embryo culture no significant effects were observed by treatment applied.

Keywords: *Zantedeschia*, micropropagation, *Pectobacterium*, seed, embryo rescue.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La floricultura es una actividad económica de suma importancia a nivel mundial, Europa cuenta con más del 90 % de la demanda de flores de corte y plantas en maceta y sus países son los principales proveedores de su mercado. Las naciones de la zona Asia-Pacífico son los distribuidores para Japón y Hong Kong, África, Medio Oriente y otros, por su parte Colombia y Ecuador dominan el mercado de Estados Unidos. En los últimos tres años, el valor de las exportaciones de flores mexicanas ha disminuido parcialmente, sin embargo, nuestras importaciones de flores de corte también han decrecido ya que la producción nacional satisface la demanda de nuestro país. (International Trade Center, 2020). Más del 80 % de la producción se destina al consumo interno, en el 2011 el valor de la floricultura fue de 5 mil 646 millones de pesos en una superficie sembrada de 18 mil 629 hectárea (SIAP, 2011). El grupo de flores de corte que produce nuestro país es amplio, entre ellas encontramos al alcatraz, cartucho, cala lily o arum lily.

El alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng), es una planta ornamental utilizada como flor de corte, maceta o para adornar jardines. Es originaria de África, forma parte de la familia Araceae y es una de las flores más apreciadas (Nery et al., 2015). En México, se cultiva principalmente el alcatraz criollo o blanco con un valor de la producción de 608,370 pesos (SIAP, 2018). Se produce en Baja California Sur, San Luis Potosí, Oaxaca y Veracruz, en este último estado se le puede encontrar asociado con otros cultivos, ya sea con otras especies ornamentales o con maíz.

La flor de alcatraz también se ha vuelto una especie de símbolo de identidad nacional por las famosas pinturas de Diego Rivera asociando a las indígenas con esta planta ornamental.

La introducción de nuevas variedades de alcatraz como flor de corte representa una ventaja competitiva para los floricultores mexicanos ante un mercado que

demanda materiales nuevos, para esto la propagación mediante el cultivo de tejidos ha resultado útil para obtener altas tasas de multiplicación. Además del alcatraz criollo existen cultivares novedosos que cumplen con las características que exige el mercado. ‘Deja vu’, es la primera variedad de alcatraz registrada en México y ‘Utopía’ es la segunda, y ambas no han sido cultivados *in vitro*, por lo que resulta importante su propagación y evaluación en condiciones *in vitro* para obtener plantas libres de patógenos.

En el cultivo de alcatraz la pudrición blanda causa pérdidas económicas a nivel mundial, en nuestro país, específicamente en Veracruz, el 90 % de campos de producción se encuentran contaminados por patógenos asociados a pudriciones del rizoma, este problema también impacta en el cultivo de tejidos debido a que la contaminación en las primeras etapas impide el avance del proceso, por lo que el escalamiento se ve afectado.

Objetivo general

Generar conocimiento sobre el establecimiento y multiplicación *in vitro* del alcatraz criollo, y de los cultivares Deja vú y Utopía (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Objetivos específicos

Desarrollar, comparar y valorar diferentes esquemas de control de contaminantes *in vitro* para semillas de alcatraz criollo y rizomas de los cultivares Utopía y Dejavú (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) con base en el diagnóstico fitosanitario.

Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de alcatraz criollo en diferentes condiciones de cultivo.

Establecer y evaluar un protocolo para la obtención de plántulas a partir de rescate de embriones de alcatraz.

Hipótesis

Es posible obtener plántulas libres de enfermedades a través del cultivo *in vitro* de rizomas, semillas y embriones bajo diferentes condiciones de cultivo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Situación mundial y nacional de la producción de alcatraz

Nueva Zelanda es uno de los países más representativos en producción de alcatraz, el crecimiento de las exportaciones de esta flor alcanzó un máximo de 5.1 millones de dólares a fines de la década de 1990, no obstante, entre el año 2000 y 2009, las exportaciones de flores cortadas disminuyeron en un 51% mientras que el valor de las exportaciones de material de plantación casi se duplicó durante este mismo período. Asia, es uno de los principales consumidores de tallos y rizomas de alcatraz seguido de Estados Unidos de Norte América para el consumo de flores de corte, y países bajos (Holanda) para rizomas (Kamenetsky & Okubo, 2012).

En México, este aumento de la importación de bulbos, tubérculos, raíces tuberosas, bulbillos, coronas y rizomas provenientes de Nueva Zelanda (Statistics New Zealand, 2021) se puede traducir en un incremento de la actividad florícola de nuestro país al obtener material vegetal, cuya demanda no se satisface de manera interna. En México, se cultiva principalmente el alcatraz criollo o blanco con un valor de la producción de 608,370 pesos (SIAP, 2018). Se sabe que se produce alcatraz en todo el país, aunque la producción en México se concentra en Baja California Sur y este cultivo también se encuentra en Oaxaca (INAFED, 2010), en el Estado de México y en Veracruz.

2.2 . Descripción general del alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)

El género *Zantedeschia* se divide en dos secciones o grupos botánicos; la sección *Zantedeschia* y la sección *Aestivae*, la primera comprende las especies *Z. aethiopica* y *Z. odorata*, y la sección *Aestivae* engloba a *Z. albomaculata*, *Z. rehamannii*, *Z. elliottiana*, *Z. jucunda*, *Z. valida* y *Z. petlandii* (Wei et al., 2017). Se ha demostrado, que la sección *Aestivae* es más susceptible a la pudrición blanda causada por bacterias del género *Pectobacterium* debido en parte a la adaptación ecológica de cada sección (Guttman et al., 2021), este problema ha mermado la producción de alcatraz por lo que se introdujeron técnicas de cultivo *in vitro* para la obtención de plantas libres de patógenos. (Cohen, 1981; Ruiz et al., 1996)

El alcatraz blanco; *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng es la especie más conocida, pero hay otras seis especies con flores de colores que van del rosa al marrón, son plantas con peciolo esponjosos y alargados, láminas foliares de forma muy variable, normalmente variegadas o maculadas, inflorescencia solitaria rodeada por la espata, pedúnculo casi tan largo como el peciolo y rizomas gruesos (Fig. 1) (Letty, 1973) cubiertos de yemas que producen brotes primarios que se diferencian en hojas (Le Nard & De Hertogh, 1993) cuyo patrón de crecimiento es simpodial (Halligan et al., 2004).

Las flores femeninas están intercaladas con estaminodios (Letty, 1973), las plantas de esta especie presentan una marcada protoginia y son autoincompatibles (Singh et al., 1996), es decir, carece de autofecundación por lo que la polinización se realiza de forma cruzada (Panetta, 1988), el pedúnculo permanece erguido durante la fructificación, a diferencia de *Z. rehmannii* y *Z. albomaculata* en cuyo caso se dobla hasta que el ápice de la espata toca el suelo donde las semillas geminan. Los frutos son bayas que se tornan color naranja, suaves y mucilaginosos cuando maduran, la parte superior de la espata se marchita mientras la parte inferior se mantiene verde, las semillas de la sección

Zantedeschia son coriáceas, subglobosas u ovoides, a menudo comprimidas y cada fruto contiene de 1 a 12 semillas (Letty, 1973).

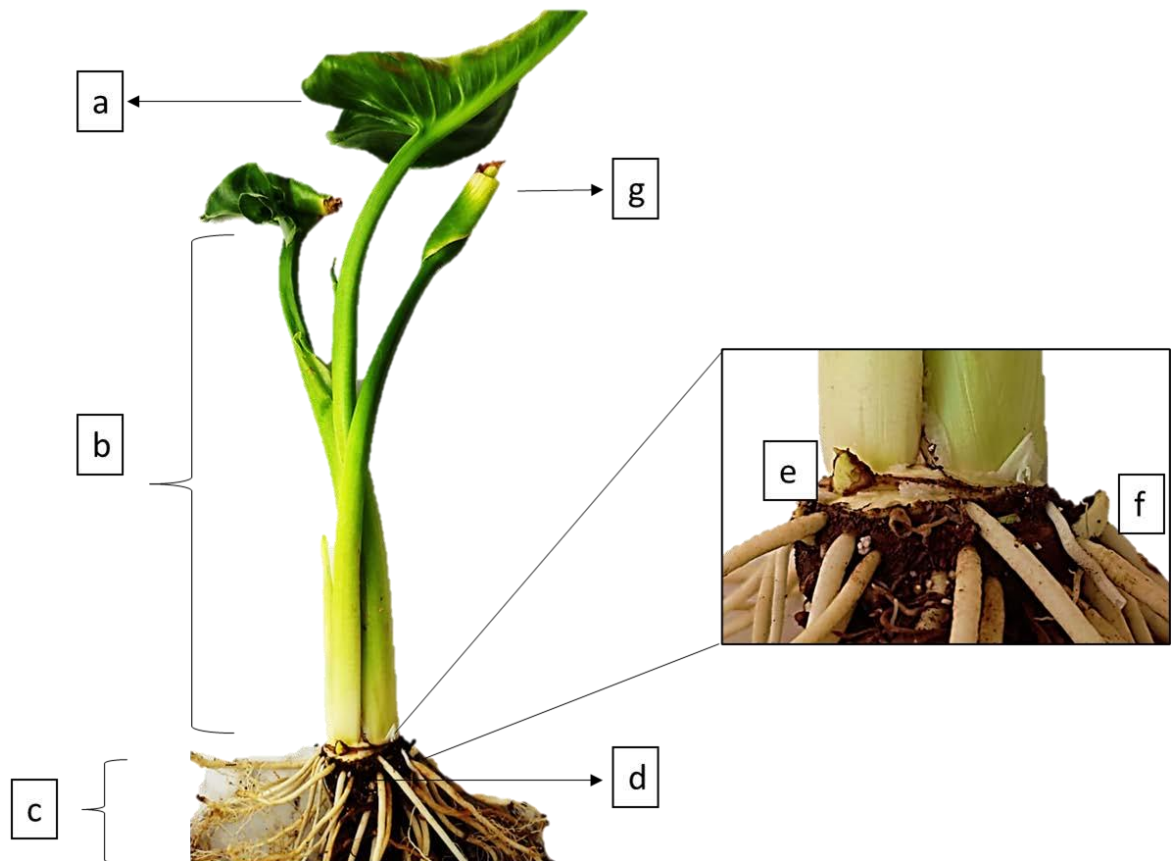


Figura 1. Planta madura perteneciente a alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) var. Utopía donde se aprecian: (a) hoja; (b) peciolo; (c) raíces; (d) rizoma; (e) yema apical; (f) yema adventicia; (g) espata inmadura. Fuente: elaboración propia.

2.3 Organismos fitopatológicos del género *Zantedeschia*

2.3.1 Bacterias

Las enfermedades asociadas a bacterias no sólo demeritan la calidad y la producción del alcatraz, también representan un obstáculo en la multiplicación *in vitro*. Las especies del género *Pectobacterium* son las principales causantes de la pudrición bacteriana de especies del género *Zantedeschia* los síntomas comienzan con un escaso crecimiento, amarillamiento en hojas, lesiones acuosas que aparecen en el rizoma y en la base de los tallos, si la enfermedad

progresas, el tejido del rizoma comienza a tomar un aspecto macerado, las hojas y espata finalmente colapsan y termina en la muerte de la planta (Wright, 1998).

Otras bacterias asociadas son: *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas putida* (Krejzar, et al., 2008), *Pseudomonas veronii*, *Chryseobacterium indologenes* (Mikiciński et al., 2010), *Xanthomonas campestris* pv *zantedeschiae* (Joubert y Truter, 1972), *Pectobacterium chrysantemi* reportada en Taiwán (Lee., Chen & Chang, 2002), y recientemente se reportó a *Cellvibrio zantedeschiae* sp. Nov, aislada en Taiwán (Sheu, Huang, Hsu, Sheu & Chen, 2017), *Pectobacterium zantedeschiae* que anteriormente se identificaba como *Pectobacterium atrosepticum* (Waleron| et al., 2019) y a *Pectobacterium aroidearum* (Chen, Lin, & Huang, 2020).

2.3.2 Hongos

Los hongos como *Phytophthora* spp, pueden asociarse a la pudrición del rizoma, con daño en raíces, tizón en hojas, necrosis en márgenes de la hoja y espata, así como disminución de la apertura floral y colapso del pedúnculo (Paredes, 2006). Wright (1998) aisló especies de hongos asociados con síntomas de pudrición del rizoma entre ellas *Rhizoctonia*, *Phyium* y *Fusarium*, este último provoca la marchitez vascular de la cala siendo *Fusarium oxysporum* una de las cepas más virulentas y *Fusarium solani* en menor medida, los principales síntomas de esta enfermedad son: enanismo, clorosis en el margen de la hoja que avanza en forma de “V” y en ocasiones se torna marrón y finalmente el tallo puede doblarse y secarse (Ciampi et al., 2009). Otra de las enfermedades de importancia económica es la mancha foliar, cuyos síntomas abarcan márgenes cloróticos y círculos negros formados por anillos en las hojas y espata (Martínez, 2012).

2.3.3 Virus

Las enfermedades víricas, afectan una parte importante de la producción de calas, los virus que atacan frecuentemente al cultivo son el virus del moteado del clavel (CarMV), virus del mosaico del nabo (TuMV), virus moteado plateado de la sandía (WSMoV) y virus Dasheen (DsMV) (Chen, Ko, Lin, Jan & Hsu 2003). Este último, se ha calificado como el más prevalente entre los Aroides, se

distribuye en la India (Ram, Joshi, Verma, Kulshrestha, Raikhy, Hallan & Zaidi, 2003), Bosnia y Herzegovina (Grausgruber-Gröger, Richter, Salapura, Jošić, Trkulja y Reisenzein, 2016) y República Checa, así como el virus del mosaico de la calabaza (CMV) (Mokra y Götzová 1992), el virus Dasheen presenta mosaicos en forma de estrías de diferentes tonos verdes, amarillamiento, ampollas suaves y deformaciones foliares (Cafrune, Asinari, Nome & Perotto, 2011)

Pham, Langeveld, Lemmers y Derks (2002), identificaron, además de DsMV, el virus del mosaico de konjac (KoMV), el virus de mosaico amarillo del frijol, y un potyvirus no identificado e indicaron que este grupo no se distribuyen por igual en las distintas partes de las plantas, asimismo, observaron síntomas que iban desde mosaicos pronunciados a franjas verde claro y oscuro, manchas oscuras y/o claras en las espatas, hojas plumosas y crecimiento retardado. Para el virus de Konjac (KoMV) se han identificado a *Mizus persicae* y *Aphis gossypii* como principales vectores, al igual que la propagación vegetativa y la transmisión mediante semillas, sus síntomas se manifiestan como mosaicos, islas verdes, clorosis intervenal, deformidad de las hojas, pedúnculos cortos y manchas pigmentadas decoloradas en la espata (Liao, Mou, Chang & Tsai 2020).

El virus de la mancha clorótica de la cala (CCSV), que, a diferencia del resto, está clasificado como un tospovirus produce manchas cloróticas que van del verde claro al amarillo, afecta las hojas centrales de la planta, y se sabe que se transmite mediante *Thrips palmi* (Chen, Chen, Lin, Yeh & Hsu, 2005).

Otro de los virus que está causando daños significativos en las zonas de cultivo es el virus de mosaico de *Zantedeschia* (ZaMV), el cual produce síntomas de mosaico sistémicas a diferencia del virus Dasheen que produce lesiones locales en hojas infectadas. (Kwon, Ha, Yoon & Ryu, 2002), por último, el virus del mosaico suave de *Zantedeschia* (ZaMMV), es un potyvirus aislado del cultivar Black Magic en Taiwán, y puede manifestarse como manchas y rayas amarillas, islas verdes y un mosaico suave inusual de acuerdo con lo reportado en Italia (Rizzo et al., 2015).

2.4 Métodos de diagnóstico biológicos y moleculares.

Dado que los hongos, bacterias y virus pueden causar síntomas parecidos, son necesarias técnicas de diagnóstico precisas y oportunas con el fin de tener certeza acerca de los causantes sobre los que se aplicarán las acciones de control y erradicación y que estas sean eficientes. En el caso de hongos y bacterias se puede presentar varias morfologías de colonias, la experiencia con variantes de colonias de grupos conocidos puede ayudar a distinguirlas, sin embargo, en la identificación de patógenos del género *Pectobacterium*, una vez que se conoce el género, las pruebas bacteriológicas y la serología no siempre son consistentes para la identificación de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* y *P. chrysanthemiv* (Álvarez, 2004), con base en pruebas bioquímicas, perfiles de ácidos grasos y métodos moleculares, entre otros, se logró distinguir nuevas especies como *P. zantedeschiae* (Waleron et al., 2019).

En cuanto a virus, Lesemann y Winter (2000), indicaron que para la detección de potyvirus en *Zantedeschia* spp el uso de la prueba de ELISA es eficiente, principalmente para Dasheen Mosaic Virus (DsMV). En contraste, Ramírez et al. (2005), afirma que el diagnóstico inmunoquímico utilizado en programas de certificación masiva tiene un límite de sensibilidad que puede permitir escape de material vegetal contaminado, por lo que asegura que con el uso de técnicas moleculares de diagnóstico se puede detectar pequeñas concentraciones virales en plantas *in vitro*. La reacción en cadena de polimerasa (PCR en inglés) es una técnica de detección rápida, con alta sensibilidad y en la cual el organismo o virus a identificar no necesita ser cultivado previamente (Palacio-Bielsa, Cambra y López, 2009). La PCR, las técnicas basadas en la obtención de huellas digitales (RNA fingerprinting) de dos poblaciones de ARN mensajero y la construcción y secuenciación de bibliotecas de cDNAs son útiles en la confirmación de la expresión diferencial de genes durante el proceso de infección de un organismo patógeno en una planta huésped (González-Candelas, Sánchez-Torres & Marcos, 2008).

Un método práctico para la identificación de virus es el uso de plantas indicadoras, se pueden utilizar plantas de *Tetragonia expansa* como indicadoras para el virus del mosaico de *Zantedeschia* (ZaMV) (Kwon, Ha, Yoon & Ryu, 2002).

2.5 Métodos de control y erradicación

Las especies de la familia *Pectobacterium* se propagan fácilmente a través de material en descomposición y no hay agentes de control actualizados para la enfermedad que causan (Wolf et al., 2021). Wright, Triggs y Burge (2004) redujeron sustancialmente la incidencia y severidad de la pudrición blanda con la siembra en un sustrato de aserrín, con malla sombra y un pretratamiento a los rizomas con hidróxido de cobre 0.08 %, thiram 0.12 %, y benomilo al 0.03 %. También, con thiram 0.12 %, hidróxido de cobre 0.08 % y quintozeno 0.15 % durante la etapa de crecimiento, y la eliminación de plantas enfermas.

La aplicación de estreptomicina a 200 mg L⁻¹ durante 30 minutos y formaldehído al 10% (v/v) durante 1 hora a los rizomas reflejaron efectividad en especies de la sección *Aestivae* (*Z. rehmannii* superba Engl., *Z. elliotiana* x *maculata* (Hook.) Engl., y *Z. albomaculata* (W. Watts.)) en la producción de plantas en maceta (Kuehny, Branch, Holcomb & Chang, 1998).

Como control biológico de *Pectobacterium carotovorum* sbsp. *carotovorum* se perfila la alta especificidad del virus bacteriófago PP1 de la familia podoviridae (Lim et al., 2013) y el uso de *Bacillus*, específicamente se encontró que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* reduce el crecimiento fitopatógeno en condiciones *in vitro* e invernadero, además, al utilizarlo como pretratamiento a los rizomas se registró un incremento en los niveles de crecimiento y un mayor número de brotes (He et al., 2021).

Para la enfermedad causada por el virus del mosaico de *Zantedeschia* (ZaMV) se comprobó que el tratamiento térmico de los protocormos no ha sido exitoso para su eliminación (Kwon, Ha, Yoon & Ryu, 2002).

2.6 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Las células vegetales, tienen la capacidad de regenerar una planta completa a partir de células aisladas (Birnbaum & Sánchez Alvarado, 2008). Haberlandt, intentó el primer cultivo de células vegetales con la finalidad de desarrollar una forma de explorar la morfogénesis y demostrar la totipotencia de las células vegetales, desde entonces hasta ahora se conocen las siguientes áreas de aplicación del cultivo de tejidos vegetales; la producción de productos farmacéuticos y otros productos naturales; la mejora genética de los cultivos; la generación de clones libres de enfermedades, la conservación de germoplasma valioso, la multiplicación clonal rápida de variedades seleccionadas (Murashige, 1974) y al mismo tiempo generar variedades nuevas para ponerlas en el mercado de forma más rápida.

El cultivo *in vitro* de tejidos puede definirse como el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos o plantas enteras bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (Thorpe, 2007). Se inicia una vez identificado un problema a resolver, la selección del genotipo y el tipo de protocolo adecuado para abordarlo. Las técnicas de cultivo de tejidos para la micropropagación de plantas, la transformación genética, la selección asistida por biotecnología, la mutagénesis, etc., se basan en dos procesos fundamentales de morfogénesis: la organogénesis y la embriogénesis somática (García-González, Quiroz, Carrasco & Caligari, 2010) y en general se dividen en cinco etapas.

2.7 Etapas del cultivo *in vitro*.

2. 7.1 Etapa 0:

El control de la contaminación *in vitro* comienza con el manejo fitosanitario del material donante, este paso es considerado importante para el establecimiento exitoso y la eventual multiplicación en las etapas I y II (Bhojwani & Dantu, 2013).

2.7.2. Etapa I

En el establecimiento de explantes provenientes de rizoma la contaminación endófitica es uno de los más grandes problemas, el flameo de los explantes provenientes de rizoma resultó ser efectivo para controlar la contaminación en

comparación de tratamientos con Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % (v/v) + dos gotas de Tween 80 (v/v) como surfactante (Ruiz et al., 1996), sin embargo, el establecimiento aséptico para *Z. aethiopica*, *Z. albomaculata* y *Z. elliottiana* fue posible con el uso de fungicidas como Physan[®] (1000 mg L⁻¹) + Benlate[®] (1000 mg L⁻¹) en agitación durante 3 horas seguido de etanol al 70 % (v/v) y NaOCl al 3 % (v/v) (Chang et al., 2003).

Otros estudios han demostrado que para disminuir la persistencia de patógenos el uso de HgCl₂ de 0.1 a 0.2 % (p/v) durante 15 minutos para segmentos de rizoma (Xiao-chun, 2010) o durante 30 minutos para hoja y rizoma a dosis de 0.1 y 0.2 % (p/v) respectivamente con un tratamiento previo con Benlate al 1 % (p/v) en agitación durante 30 minutos (Hlophe, Moyo, Van Staden & Finnie, 2015). Incluso dosis de 0.5 % de HgCl₂ (p/v) durante 15 minutos son eficaces para esta etapa en *Z. rehmannii* con un pretratamiento de inmersión en etanol al 70 % (v/v) 30 segundos (Kulpa, 2016), a pesar de esto, se encontró en otros estudios sobre impacto ambiental que concentraciones desde 0.25 mg L⁻¹ puede causar consecuencias negativas en el desarrollo de anfibios (Muñoz-Escobar & Palacio-Baena, 2016).

El uso de antibióticos y fungicidas sistémicos es otra opción para el control de bacterias y hongos endófitos. En los años 90's, Kritzinger et al. (1997) utilizaron un pretratamiento de fungicida con Captab 500 WP[®] (5 g L⁻¹) y Dithane[®] M-45 (I.A. mancozeb) (5 g L⁻¹) en agitación en diferentes periodos seguido una combinación comercial de antibióticos compuesta de penicilina (10000 U), 10 mg/ml de estreptomicina, 25 µg ml⁻¹ de amphotericin B e imepenem (12.5 g L⁻¹) en agitación durante cinco días, y obtuvieron 0 % de contaminación bacteriana en *Z. aethiopica*. Desde entonces hasta ahora este antibiótico se sigue utilizando como un tratamiento de desinfestación en sinergia con oxytetraciclina. Villaseñor, Villela & Villarruel (2018) utilizaron como esquema de desinfestación una solución de cloro al 15 % (p/p) seguido de 500 mg L⁻¹ de estreptomicina, 500 mg L⁻¹ de oxitetraciclina y 500 mg L⁻¹ de captán[®] (I.A. carboxamida) durante 60 minutos y

finalmente los explantes pasaron a una solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos.

De igual manera, la aplicación de dióxido de cloro (ClO_2) a una concentración de 60~180 mg L^{-1} (v/v) durante cinco minutos seguido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 5 % (v/v) durante 15 minutos brindaron un porcentaje de supervivencia >75% para la especie *Z. aethiopica* L. K. Spreng (Chen et al., 2017).

En este apartado es importante considerar que en los últimos años ha habido un aumento en la resistencia bacteriana a los antibióticos, por lo que es necesario utilizarlos de manera restringida (Andersson, 2003), además de utilizar métodos que tengan menor impacto ambiental. Recientemente Hashemidehkordi, Mortazavi y Azadi (2021) evaluaron el efecto del agua caliente en la desinfección de explantes de rizoma y consiguieron un porcentaje de más de 90 % de supervivencia a 45 °C por 35 minutos seguido de inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % (v/v) durante 10 minutos, este procedimiento representa una buena alternativa para disminuir la aplicación de productos ya mencionados y lo que implica en cuanto al impacto ambiental, económico y en la resistencia a los antibióticos. Las estrategias utilizadas en esta etapa para la desintegración de contaminantes *in vitro* de alcatraz (*Zantedeschia spp*) se indican en el Cuadro 1.

A pesar de que los autores mencionaron a *Pectobacterium carotovorum* como el principal agente fitopatógeno a controlar en el cultivo *in vitro*, ninguno de los trabajos señalados procedió a realizar un diagnóstico fitosanitario previo a la iniciación del cultivo.

Cuadro 1. Resumen de las estrategias aplicadas en la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro* de alcatraz (*Zantedeschia* spp.).

Material vegetal	Origen del explante	Método de control	de	Observaciones	Referencia
<i>Z. aethiopica</i> L. K. Spreng	Rizoma	Inmersión de rizomas disectados en solución de etanol al 95% 1 minuto, y flameo dos veces		80 % de supervivencia	Ruíz- Sifre et al., 1996
<i>Z. aethiopica</i> y <i>Z. albomaculata</i> , <i>Z. elliottiana</i>	Rizomas libres de virus de mosaico de la calabaza (CMV)	Inmersión de rizomas en solución de Physan (1000 mg L ⁻¹) +Benlate (1000 mg L ⁻¹) durante 3 horas en agitación.		Supervivencia de los explantes no reportada	Chan et al., 2003
<i>Z. hybrida</i>	Rizoma	HgCl ₂ de 0.1 a 0.2 % durante 15 minutos para segmentos rizoma		Método adecuado para la obtención de plantas libres de patógenos.	Xiao-chun, 2010
<i>Z. aethiopica</i>	Hoja y rizoma	HgCl ₂ a 0.2 % para segmentos de rizoma y 0.1% para hoja durante 30 minutos		28 % de descontaminación para rizoma y 78.3 % para hoja	Hlophe, Moyo, Van Staden & Finnie, 2015
<i>Z. rehmannii</i>	Rizoma	Inmersión en HgCl ₂ al 05 % durante 15 minutos		73% de descontaminación	Kulpa, 2016
<i>Z. aethiopica</i> L. K. Spreng	Rizoma	Pretratamiento con Captab 500		0 % de contaminación	Kritzinger et al., 1997

				WP ® (5 g L ⁻¹) y Dithane ® M-45 (I.A. Mancozeb) (5 g L ⁻¹) + inmersión en penicilina (10000 U), 10 mg/ml de estreptomicina, 25 µg ml ⁻¹ de amphotericin B e imepenem (12.5 g L ⁻¹) en agitación durante cinco días Cloro al 15 % (p/p) + 500 mg L ⁻¹ de estreptomicina, 500 mg L ⁻¹ de oxitetraciclina y 500 mg L ⁻¹ de captán ® (I.A. Carboxamida) durante 60 minutos + etanol al 70 % (v/v) durante 30 segundos. Dióxido de cloro (ClO ₂) a 60~180 mg L ⁻¹ (v/v) cinco minutos + peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al 5 % (v/v) 15 minutos Baño de agua a 45°C por 35 + inmersión en etanol al 70 % durante 30 segundos e hipoclorito de sodio (NaOCl) al		
<i>Z. aethiopica</i> L. Spreng	Rizoma			No reportado	Villaseñor, Villela & Villarruel, 2018	
<i>Z. aethiopica</i> L. Spreng	Yemas rizoma	de		Porcentaje de superviviencia >75%	Chen et al., 2017	
<i>Zantedeschia</i> spp cv. Orania and Sunclub	Yemas rizoma	de		Porcentaje de superviviencia >90 %	Hashemid ehkordi et al., 2021	

1 % (v/v) durante
10 minutos

2.8. Respuestas morfogénicas *in vitro* de plantas

2.8.1 Organogénesis directa

La organogénesis directa implica la formación de un primordio unipolar a partir del cual se formará el meristemo apical que dará origen a los órganos aéreos de la planta (Brown & Thorpe, 1996), a través de esta vía se han obtenido plantas libres de patógenos mediante el cultivo de meristemos. En el Cuadro 2, se muestra un resumen sobre los estudios relacionados con la organogénesis directa del alcatraz. Así, Chang, Charkabarty, Hahn y Paek, (2003) estudiaron diferentes factores que influyen en la respuesta organogénica como la concentración de reguladores de crecimiento para la obtención de plántulas de *Z. albomaculata* a partir de ápices, sus resultados mostraron que con la concentración de BA (8.87 μM) generó una tasa de multiplicación de 3.8 brotes por explante y con TDZ (4.54 μM) 3.2 brotes por explante, por otra parte, en el cultivo de ápices de *Z. aethiopica*, la adición de BAP y sulfato de adenina (SA) tuvo un efecto positivo en el número de brotes obtenidos por explante (2.6) solo BAP mostró significancia a la concentración de 22.19 μM (Ribeiro, Pasqual, da Silva & Rodrigues, 2014).

El rizoma ha sido el principal órgano destinado para la obtención de explantes. Singh, Rathore, Choudhary y Shekhawat (2009) obtuvieron de cinco a seis brotes de *Z. aethiopica* en medio semisólido de Murashige y Skoog (MS) con 10.0 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP) y aditivos (50.0 mg L^{-1} de ácido ascórbico; 25.0 mg L^{-1} de cada uno de sulfato de adenina, L-arginina y ácido cítrico) mientras que en *Z. rehmannii*, Kulpa (2016) condujo la iniciación del cultivo con una concentración equivalente UU a 3 mg L^{-1} de BAP y la mayor tasa de multiplicación (4.3 brotes por

explante) se obtuvo con 2.5 mg L^{-1} de BAP.

Cuadro 2. Resumen de las investigaciones relativas a la organogénesis directa de alcatraz (*Zantedeschia* spp).

Especie	Origen del Explante	Medio	Reguladores de Crecimiento	Observación	Referencias
<i>Z. albomaculata</i> var "Black magic"	Ápices	MS	BA (8.87 μ M) Y TDZ (4.54 μ M)	Tasa de multiplicación de 3.8 brotes por explante con BA, 3.2 brotes por explante con TDZ	Chang et al., 2003
<i>Z. aethiopica</i>	Rizoma	Ms	10.0 mg L ⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) y aditivos (50 mg L ⁻¹ de ácido ascórbico; 25 mg L ⁻¹ de cada uno de sulfato de adenina, L-arginina y ácido cítrico	5-6 brotes por explante	Singh, Rethore & Choudhar y 2009

<i>Z. rehmannii</i>	Yemas de rizoma	Ms + 100 mg L ⁻¹ ácido ascórbico (AA)	3 mg L ⁻¹ y 2.5mg L ⁻¹ BAP	Tasa de multiplicación de brotes por explante	4.3 por	Kulpa, 2016
<i>Z. aethiopica</i>	Ápices	MS	22.19 µM BAP	2.6 brotes por explante		Ribeiro, Pasqual, da Silva & Rodrigues, 2014

2.8.2. Organogénesis indirecta

Las células somáticas vegetales se pueden reprogramar mediante un proceso de dediferenciación causado por señalizaciones externas específicas, con lo cual se formarán meristemas adventicios con la capacidad de generar nuevos órganos (Bloom, 1937). Shin, Bae y Seo (2019) reconstruyeron el proceso de regeneración de brotes a partir de callo y diferenciaron cuatro fases; adquisición de pluripotencia (en un medio rico en auxinas), formación de promeristemas, establecimiento del progenitor de brotes y crecimiento de brotes.

Jonytienè, Masienè, Burbulis y Blinstrubienè (2017) estudiaron los factores que afectan la dediferenciación *in vitro* en *Z. aethiopica* y *Z. elliotiana*, utilizaron segmentos de peciolo, discos de hoja y de espata y obtuvieron más de 80 % de formación de callo en medio de MS complementado con AIA (0.5 mg L⁻¹) + BAP (2.0 mg L⁻¹) para hoja, AIA (2.0 mg L⁻¹) + BAP (2.0 mg L⁻¹) para espata y AIA (1.0 mg L⁻¹) + BAP (2.0 mg L⁻¹) para peciolo, siendo este el que manifestó la mayor capacidad de dediferenciación entre los tipos de explantes probados, además,

Z. elliottianna tuvo una capacidad de diferenciación más alta que *Z. aethiopica*, sin embargo, y tuvo la capacidad de generar callo a altas dosis de BAP (4.0 mg L^{-1}) en combinación con ANA (0.1 mg L^{-1}). La prueba de viabilidad mediante Cloruro de tetrazolio (CTT) indica que los callos deben ser subcultivados a los 20 días (SUB2) después de 30 días de cultivo *in vitro*, cuando alcanzan la fase exponencial de división celular (Nery et al., 2018).

En *Zantedeschia spp*, la formación de callo se dio al cultivar segmentos de hoja en un medio MS suplementado con 2,4-D (2.0 mg L^{-1}) y BA (2.0 mg L^{-1}) o con ANA (2.0 mg L^{-1}) y BA (2.0 mg L^{-1}) (Gong et al., 2008). Li, Qu y An (2009), indujeron la formación y crecimiento de callo a una dosis más baja de ANA (0.1 mg L^{-1}) y a la misma concentración de BA (2.0 mg L^{-1}) para hoja y rizoma. Con el establecimiento de segmentos nodales de *Z. aethiopica* se obtuvieron porcentajes de formación de callo del 53%, y 47% en medios suplementados con 2,4-D ($1.0\text{-}2.0 \text{ mg L}^{-1}$). Se encontraron los siguientes compuestos en tejido del callo: fenoles totales ($802.47 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), almidón ($19.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), azúcares solubles totales ($3.1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), azúcares reductores ($1.2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), azúcares no reductores ($1.8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), extracto de éter (1.0%) y proteínas (20%). Estos compuestos pueden ayudar a comprender los procesos de dediferenciación celular que tienen lugar en esta especie (Nery et al., 2015).

El equilibrio hormonal y la interrelación entre la auxina y la citoquinina son cruciales para la determinación del destino y el patrón celular (Cheng et al., 2013). Esta relación ha sido ampliamente estudiada en la obtención de plantas a través de callogénesis, Lee y Ko (2005) obtuvieron hasta 56.7% de formación de callo en un medio con BA (2.0 mg L^{-1}) y un porcentaje de regeneración de brotes del 70 % con BA (3.0 mg L^{-1}). Las citoquininas indujeron la formación de brotes múltiples; 2ip (1.0 mg L^{-1}), BA (5.0 mg L^{-1}) y BA (1.0 mg L^{-1}) indujeron 16, 14 y 12 brotes múltiples en los cvs. Sunlight, Chiente y Pink Persuasion, respectivamente. El crecimiento de las raíces en los cvs. Sunlight y Chiente se mejoró con 1.0 mg L^{-1} de IAA. Mientras que el cv. Pink Persuasion mostró un mayor crecimiento de las raíces con 2.0 mg L^{-1} de IBA. También, encontraron

que la adición de 70 a 90 g L⁻¹ de sacarosa mejora la formación del rizoma *in vitro*. Xiao-chun (2010) promovió la formación de callo en un medio MS+2.0 mg L⁻¹ 6-BA+ 0.1~0.2 mg L⁻¹ NAA y logró un enraizamiento del 100% con un medio MS + IBA (0.3 mg L⁻¹). En el cuadro 3 se resumen los trabajos sobre inducción de callo en especies de *Zantedeschia*.

Cuadro 3. Resumen de las investigaciones sobre la organogénesis indirecta de alcatraz (*Zantedeschia* spp).

Especie	Origen del Explante	Medio	Reguladores de Crecimiento	Referencias
<i>Zantedeschia hybrida</i> "Feng yang"	Rizoma	MS	6-BA (2.0 mg L ⁻¹) + ANA (0.1 ~ 0.2 mg L ⁻¹)	Xiao-chun 2010
<i>Zantedeschia</i> spp. Sunlight, cv. Chianti, cv. Pink Persuasion	Ápices derivados de brotes de callo y brotes adventicios	MS+ 70 a 90 g/L sacarosa	BA (2-3 mg L ⁻¹)	Lee & Ko, 2005.
<i>Zantedeschia</i> sp. Var "pink giant"	Hoja	MS	2,4-D (2.0 mg L ⁻¹) y BA (2.0 mg L ⁻¹) o NAA (2.0 mg L ⁻¹) y BA (2.0 mg L ⁻¹).	Gong, Qu, You, Sun & Wang, 2008.
<i>Zantedeschia hybrida</i>	Hoja y rizoma	MS	6-BA (2.0 mg L ⁻¹), ANA (0.1 mg L ⁻¹)	Chen, Li, Qu & An, 2009.
<i>Zantedeschia aethiopica</i> , <i>Zantedeschia elliottiana</i>	Hoja, peciolo y espata	MS	6-BAP (1-2 mg L ⁻¹), KIN (1-2 mg L ⁻¹), AIA (0.25; 0.5; 1.0; 2.0 mg L ⁻¹), IBA (0.25; 0.5; 1.0; 2.0 mg L ⁻¹)	Jonytiené, Masiené, Burbulis, Blinstrubiené, 2017

<i>Z. aethiopica</i>	Segmentos nodales	MS	2,4-D (1.0-2.0 mg L ⁻¹)	Nery et al., 2015
<i>Z. aethiopica</i>	Brotes obtenidos <i>in vitro</i>	MS+3% sacarosa y 0.7% agar.	(BA) (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 and 6.0 mg L ⁻¹) + 0.1 mg L ⁻¹ (NAA).	Nery et al., 2018

2.8.3. Embriogénesis somática

El desarrollo de una planta con flores comienza con la división de un óvulo fertilizado para formar un embrión con una organización polarizada: la parte apical del embrión formará el brote, la parte basal, la raíz y el tallo (Roberts, Alberts, Johnson, Walter & Hunt, 2002). La embriogénesis somática, reinicia secuencias de desarrollo embrionario en células desdiferenciadas para generar estructuras bipolares con una clara distinción entre el meristemo de la raíz y el del brote (Méndez-Hernández et al., 2019).

Las etapas ontogénicas de la embriogénesis somática son iguales a las que se presentan en embriones cigóticos, es decir, las etapas globulares, corazón, torpedo y cotiledonar (Nic-Can et al., 2016). El primer trabajo reportado sobre embriogénesis somática en alcatraz se realizó para tres híbridos con explantes provenientes de rizomas y anteras, sin embargo, la formación de embriones somáticos sólo se logró a partir de segmentos de rizoma. Los mejores resultados se obtuvieron en medios suplementados con ANA (2.0 mg L⁻¹) y BA (0.6 a 2.0 mg L⁻¹). La conversión en plántulas normales se logró en medio MS suplementado con vitaminas, micro y macronutrientes, 1.0 mg L⁻¹ 2iP, 3% de sacarosa y 0.7% de agar (Duquenne, Eeckhaut, Werbrouck & Van Huylenbroeck, 2006), posteriormente se demostró que la combinación de auxina y citoquinina tiene efectos positivos tanto en la inducción de callos embriogénicos como en la formación de brotes, Han y Kim (2019) cultivaron segmentos de tallo que contenían meristemos apicales derivados del cultivar “Gag-si” en medio MS,

obtuvieron un 25% de tasas de inducción de callos embriogénicos amarillos con el medio MS + 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 1.5 mg L⁻¹ de BA. En los experimentos de regeneración a partir de callos embriogénicos mediante la formación de brotes. el medio MS suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de IAA y 2.0 mg L⁻¹ de BA mostró las tasas más altas, de aproximadamente el 85 ~ 90%, con respecto a la formación de brotes. En el cuadro 4 se muestra el resumen de las investigaciones sobre embriogénesis somática de especies del género *Zantedeschia*.

Cuadro 4. Resumen de las investigaciones relativas a la embriogénesis somática de alcatraz (*Zantedeschia* spp).

Especie	Origen del Explante	Respuesta	Medio	Reguladores de crecimiento	Referencia
Híbridos de <i>Zantedeschia</i> spp. 'Captain Tendens', 'Majestic Red' y 'Florex Gold'	Rizomas y anteras	Embriogénesis somática	MS	6-BA, 0.22 mM TDZ Y 10.74 mM ANA	Duquenne Eeckhaut & Werbrouck 2006
<i>Zantedeschia hybrida</i>	Pecíolo	Embriogénesis somática	MS	0.5 mg L ⁻¹ de NAA y 1.5 mg L ⁻¹ de BA, con 0.5 mg L ⁻¹ de IAA y 2.0 mg L ⁻¹ de BA	Han & Kim (2019)

2.9. Cultivo de células en suspensión o en medios líquidos.

Las investigaciones realizadas con alcatraz se han enfocado en la determinación de la frecuencia óptima de inmersión, la comparación de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) con otros sistemas de cultivo como el semisólido y líquido en agitación, el efecto de ciertos reguladores de crecimiento y parámetros de cultivo sobre la calidad de los brotes. Sánchez et al. (2009), obtuvieron un coeficiente de

multiplicación de 9.7 brotes por explante, mediante yemas activas obtenidas de rizoma de *Zantedeschia spp* utilizando un medio MS modificado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g de tiamina, 4 mg L⁻¹ de BAP además del empleo de Paclobutrazol a 0.3 mg L⁻¹ y una frecuencia de inmersión de 4 horas durante 4 minutos. Sánchez et al. (2010), obtuvieron una tasa de multiplicación de 7.93, 10.66 y 11.30 brotes por explante en un medio MS + 1, 2 y 4 mg L⁻¹ BA y una frecuencia de inmersión de 4 horas durante 3 minutos, mientras que Ruffoni y Savona (2005) lograron un coeficiente de 3.44 brotes por explante de *Z. aethiopica* L. Spreng al programar una frecuencia de inmersión de 3 horas durante 3 minutos con 4 mg L⁻¹ BA en un biorreactor RITA ®, el cual es evidentemente menor en comparación con los ya mencionados.

2.9.1 Otras aplicaciones de las técnicas *in vitro*.

2.9.2. Cultivo de embriones cigóticos o germinación *in vitro*

El uso de semillas como explante en el cultivo de tejidos ofrece la oportunidad de seleccionar una característica particular, por ejemplo, floración temprana, tolerancia a la sal, a la temperatura o para el desarrollo de clones mejorados. La clonación de plántulas provenientes de semillas de germinación temprana de *Z. aethiopica* 'Green Goddess' y sometidas a diferentes temperaturas ambientales y concentraciones de sal (NaCl) en el medio resultó en el crecimiento y floración temprana de las mismas, los individuos que se obtuvieron tempranamente a bajas temperaturas tuvieron un mayor crecimiento a temperaturas nocturnas más bajas que las germinadas a altas temperaturas. Los clones seleccionados después de la germinación a niveles más altos de cloruro de sodio (NaCl) alcanzaron un mayor crecimiento en medios que contenían sal que los que germinaron en medios sin sal (Ngamau, 2008)

En la germinación *in vitro* influyen factores como el medio de cultivo, el estado de madurez de la semilla, temperatura, la concentración de agar y sacarosa. La germinación temprana se puede dar a 20 °C, pero las tasas de germinación más altas se pueden presentar a 14 °C (Ngamau, 2001). Se sabe que reguladores del crecimiento como las giberelinas estimulan la germinación de las semillas, Nery

et al. (2015) observaron el efecto de cinco niveles de AG₃ (0.0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg L⁻¹) sobre la germinación de semillas de frutos maduros e inmaduros de *Z. aethiopica* cultivadas en medio MS y WPM y obtuvieron un porcentaje de germinación del 33% en medio WPM para semillas de frutos inmaduros y 24% para frutos maduros en medio MS y utilizando semillas inmaduras (20%) o maduras (10%), se obtuvieron con 0.8 o 0.2 mg L⁻¹ de AG₃, respectivamente.

2.9.3 Floración *in vitro*.

Los reguladores de crecimiento intervienen en procesos importantes como los patrones de crecimiento de la planta, influye en la floración, senescencia, entre otros procesos (Brukhin & Morozova, 2011). Naor, Kigel y Ziv (2004), investigaron el control hormonal de la inducción floral y el desarrollo de la inflorescencia *in vitro* en plantas de día neutro de *Zantedeschia spp.* Ellos estudiaron los efectos de las giberelinas (GAs, 5.8-2900 M) y de la citoquinina benciladenina (BA, 0.4-13.3 M) sobre el desarrollo de las inflorescencias en plántulas regeneradas en cultivo de tejidos, determinaron que la presencia de giberelinas fue obligatoria para el paso de la fase vegetativa a la reproductiva. El desarrollo de la inflorescencia en la yema apical se observó al cabo de 30-50 días en las plántulas tratadas con ácido giberélico (AG₃) cultivadas *in vitro*, empero, observaron inflorescencias con flores femeninas y masculinas incompletas, con BA no tuvo efecto sobre la inducción de la flor, pero, en presencia de AG₃, la BA en concentraciones de hasta 4.4 M potenció la diferenciación de la inflorescencia. Concluyeron que el inicio de la iniciación floral no está influenciado por estímulos ambientales. Naor et al. (2005) corroboraron que el AG₃ tiene una acción dual en el proceso de floración: inducción de la diferenciación de la inflorescencia y promoción de la elongación del tallo floral e infirieron que el patrón de floración podría ser resultado de un gradiente en la distribución de giberelinas y que este gradiente a lo largo de los ejes del tubérculo y del brote está probablemente controlado por la dominancia apical de la yema primaria. En el cuadro 5 se resumen las dos investigaciones sobre floración *in vitro*.

Cuadro 5. Resumen de las investigaciones relativas a la floración *in vitro* de alcatraz (*Zantedeschia* spp).

Especie	Origen del Explante	Medio	Reguladores de Crecimiento	Referencias
<i>Zantedeschia</i> spp.	Yemas de Rizoma	MS	AG ₃ , BA, AG1 Y AG4	Naor et al., 2004
<i>Z. rehmanii</i> Engl. hybrid "Calla Gold"	Plántulas de <i>Zantedeschia</i> cv. CG cultivados <i>in vitro</i> .	MS	BA (1.3 mM) y AG ₃ (200 mg L ⁻¹)	Naor, Kigel & Ziv, 2005

Conclusiones

El cultivo de tejidos es una técnica importante en la propagación masiva de plantas clonales libres de patógenos y el mejoramiento genético de las especies que conforman el género *Zantedeschia*. El tipo de explante, medios de cultivo y reguladores del crecimiento, promueven el proceso de desdiferenciación de las células y a pesar del riesgo de contaminación endógena, el rizoma predomina como el origen de explantes, esto por su capacidad organogénica de generar tanto brotes múltiples como embriones somáticos y a su vez estas vías son afectadas por factores externos como la luz y la temperatura, concentración de carbohidratos en el medio de cultivo que son determinantes para procesos como la desdiferenciación, la multiplicación de brotes, la formación de raíces y la floración. Esto último, permitirá estudiar a fondo la inducción, iniciación y desarrollo de inflorescencias de otras especies del género. La embriogénesis somática es una vía de regeneración poco explorada para la multiplicación de alcatraz, esto se convierte en una ventana de oportunidad para investigaciones futuras.

2.9.4 Literatura citada

- A. de Hertogh, M. Le Nard (1993). The physiology of flower bulbs. *Elsevier*, (p., 795).
https://books.google.com.mx/books/about/The_Physiology_of_Flower_Bulbs.html?id=bv_wAAAAMAAJ&redir_esc=y
- Alvarez, A. M. (2004). Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review. Phytopathology*, 42, 339-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140329>
- Andersson, D. I. (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 452-456.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.001>
- Birnbaum, K. D., & Sánchez Alvarado, A. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 132, 697-710.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.040>
- Brown, D. C., & Thorpe, T. A. (1986). Plant regeneration by organogenesis. En I. K. Vasil. (Ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants* (3, 49-65). Academic Press, Inc.
https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=wD2o4tdHwnkC&oi=fnd&pg=PA49&dq=Plant+regeneration+by+organogenesis+Brown,+D.+C.,+%26+Thorpe,+T.+A&ots=bE5cts_YX5&sig=yKMtw_l7Z52w8lQRjDmxmlyfS4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Brukhin, V., & Morozova, N. (2011). Plant growth and development-basic knowledge and current views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(2), 1-53. <https://doi.org/10.1051/mmnp/20116201>
- Chang, H. S., Charkabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) vía in vitro shoot tip proliferation. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(2), 129-134. <https://doi.org/10.1079/IVP2002362>
- Chen, F., Li, L., Qu, Y. T., & An, F. X. (2009). Study on Tissue Culture and Rapid Propagation Technique of *Zantedeschia hybrida*. *Northern Horticulture*, 1
- Chen, L. R., Hsiung, T. C., Lin, K. H., Huang, T. B., Huang, M. Y., & Wakana, A. (2017). Supplementary effect of hydrogen peroxide as a pre-disinfectant for sterilizing rhizome bud explants of *Zantedeschia aethiopica* L. with chlorine dioxide. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 62(1), 81-86. [10.5109/1799306](https://doi.org/10.5109/1799306)
- Cheng ZJ, Wang L, Sun W, et al. 2013. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology* 161 (1), 240-251. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203166>

- Cohen D (1981) Micropropagation of *Zantedeschia* hybrids. *Combined Proceedings-International Plant Propagators' Society*, 31, 312-316.
- Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S., & Van Huylenbroeck, J. (2006). In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zantedeschia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87(3), 329-331 <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9161-8>
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 37(3), 5–30. 10.4067/s0718-16202010000300001 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113045451>
- Gong, X. Q., Qu, F. N., You, C. R., Sun, W. T., & Wang, M. (2008). Establishment of callus induction system from leaves in *Zantedeschia*. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 3, 221-5.
- González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., & Marcos, J. F. (2008). Aislamiento e identificación de genes de fitopatógenos que se expresan diferencialmente durante la interacción con la planta. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*, 21. https://books.google.com.mx/books?id=XWcJAQAAQBAJ&dq=secuencia%20de+genes+fitopat%C3%B3genos&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Guttman, Y., Joshi, J. R., Chriker, N., Khadka, N., Kleiman, M., Reznik, N., Wei Z., Kerem Z. & Yedidia, I. (2021). Ecological adaptations influence the susceptibility of plants in the genus *Zantedeschia* to soft rot *Pectobacterium* spp. *Horticulture Research*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00446-2>
- Halligan, E. A., Brooking, I. R., Funnell, K. A., & Catley, J. L. (2004). Vegetative and floral shoot development of *Zantedeschia* 'Black Magic'. *Scientia Horticulturae*, 99(1), 55-65. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00080-3)
- Han, I. S., & Kim, J. B. (2019). Establishment of a regeneration system for the production of Calla plants (*Zantedeschia* spp.) via embryogenic callus culture. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(1), 32-36. <https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.1.032>
- Hashemidehkordi, E., Mortazavi, S. N., & Azadi, P. (2021). An Efficient in vitro Propagation Protocol of Pot Calla lily (*Zantedeschia* spp cv. Orania and Sunclub) via Tuber Production. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(4), 343-351. <https://doi.org/10.22059/IJHST.2021.317458.436>
- He, P., Cui, W., He, P., Munir, S., Li, X., Wu, Y., ... & He, Y. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* KC-1 inhibits *Zantedeschia hybrida*

- soft rot and promote plant growth. *Biological Control*, 154, 104500. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104500>
- Hernandez-Villaseñor, L. A., Reyna-Villela, M. Z., & Aceves-Villarruel, S. M. (2018). Effect of Carbamazepine on the In Vitro Propagation of *Zantedeschia aethiopica*. *International Journal of Environmental Science and Toxicology Research*, 6(2), 2-17. https://www.researchgate.net/publication/327478129_Effect_of_Carbamazepine_on_the_In_Vitro_Propagation_of_Zantedeschia_aethiopica
- Hlophe, N. P., Moyo, M., Van Staden, J., & Finnie, J. F. (2015). Micropropagation of *Zantedeschia aethiopica* (L.) spreng.: towards its commercial use in the cut flower industry. *Propagation of Ornamental Plants*, 15(2), 73-78. https://www.researchgate.net/publication/282826535_Micropropagation_of_zantedeschia_aethiopica_L_spreng_Towards_its_commercial_use_in_the_cut_flower_industry
- Jonytienė, V., Masienė, R., Burbulis, N., & Blinstrubienė, A. (2017). Factors affecting *Zantedeschia* Spreng. dedifferentiation in vitro. *Biologija*, 63(4), <https://doi.org/10.6001/biologija.v63i4.3608>
- Kareem, A., Radhakrishnan, D., Sondhi, Y., Aiyaz, M., Roy, M. V., Sugimoto, K., & Prasad, K. (2016). De novo assembly of plant body plan: a step ahead of Deadpool. *Regeneration*, 3(4), 182-197. <https://doi.org/10.1002/reg2.68>
- Kuehny, J. S., Branch, P. C., Holcomb, G. E., & Chang, W. C. (1998). Chemical treatments to control *Erwinia* soft rot of calla rhizomes. *HortTechnology*, 8(3), 353-356. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.8.3.353>
- Lee, Y. S., & Ko, J. (2005). Effect of plant growth regulators on in vitro micropropagation of colored calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Korean Journal of Plant Resources*, 18(1), 154-160. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200502612642500.page>
- Letty, C. (1973). The genus *Zantedeschia*. *Bothalia*, 11(1/2), 5-26. <https://doi.org/10.4102/abc.v11i1/2.1963>
- Lim, J. A., Jee, S., Lee, D. H., Roh, E., Jung, K., Oh, C., & Heu, S. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(8), 1147-1153. <https://doi.org/10.4014/jmb.1304.04001>
- Marloth R. (1925) The Flora of South Africa: With Synoptical Tables of the Genera of the Higher Plants, 2(1) (p. 27). *Darter bros. & Company*.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña C. & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 10, 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

- Murashige, T. (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25(1), 135–166. doi:10.1146/annurev.pp.25.060174.001031
- Ngamau, K. (2001). Development of an in vitro culture procedure using seeds from *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess' as explants. *Gartenbauwissenschaft*, 66(3), 133-139. https://www.pubhort.org/ejhs/2001/file_2937.pdf
- Naor, V., Kigel, J., & Ziv, M. (2004). Hormonal control of inflorescence development in plantlets of calla lily (*Zantedeschia* spp.) grown in vitro. *Plant growth regulation*, 42(1), 7-14. https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000014889_16196.f7
- Naor, V., Kigel, J., Ziv, M., & Flaishman, M. (2004). A developmental pattern of flowering in colored *Zantedeschia* spp: effects of bud position and gibberellin. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(4), 269-279. <https://doi.org/10.1007/BF02637250>
- Nery, F. C., Goulart, V. L. A., Viol, M. A., Paiva, P. D. O., Paiva, R., Prudente, D. O., & Nery, M. C. (2013). In vitro germination and chemical composition of *Zantedeschia aethiopica* callus. *Acta Horticulturae*, 1083, 189-196. Doi: 10.17660/Acta Hortic.2015.1083.22
- Nery, F. C., Prudente, D. O., Paiva, R., Nery, M. C., Paiva, P. D. O., & Domiciano, D. (2017, April). Micropropagation and histological analysis of Calla lily. In *VII International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants* 1224 (pp. 183-190). [10.17660/Acta Hortic.2018.1224.24](https://doi.org/10.17660/Acta Hortic.2018.1224.24)
- Ngamau, K. (2001). Development of an in vitro culture procedure using seeds from *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess' as explants. *Gartenbauwissenschaft*, 66(3), 133-139. https://www.pubhort.org/ejhs/2001/file_2937.pdf
- Ngamau, K. (2006). Selection for early flowering, temperature and salt tolerance of *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess'. *Acta Horticulturae*, 766, 155-162. Doi: 10.17660/Acta Hortic.2008.766.19
- Nic-Can, G. I., Avilez-Montalvo, J. R., Aviles-Montalvo, R. N., Márquez-López, R. E., Mellado-Mojica, E., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The relationship between stress and somatic embryogenesis. In *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications* (pp. 151- 170). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_9
- Wright, P. J. (1998) A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(4), 331-334, DOI: 10.1080/01140671.1998.9514072
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., & López, M. M. (2009). PCR detection and

- identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 249-297.
<https://www.jstor.org/stable/41998622>
- Ribeiro, M. D. N. O., Pasqual, M., da Silva, A. B., & Rodrigues, V. A. (2014). In vitro propagation of Calla lily: Adenine sulphate and 6-benzilaminopurine. *Ornamental Horticulture*, 20(1), 21-26.
<https://doi.org/10.14295/rbho.v20i1.660>
- Roberts, K., Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., & Hunt, T. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Ruiz-Sifre, G., Rosa-Márquez, E., & Flores-Ortega, C. E. (1996). Zantedeschia aethiopica propagation by tissue culture. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 80(3), 193-194.
<https://doi.org/10.46429/jaupr.v80i3.4371>
- Sheu, S. Y., Huang, C. W., Hsu, M. Y., Sheu, C., & Chen, W. M. (2017). Cellvibrio zantedeschiae sp. nov., isolated from the roots of Zantedeschia aethiopica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3615-3621.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002178>
- Shin, J., Bae, S., & Seo, P. J. (2020). De novo shoot organogenesis during plant regeneration. *Journal of experimental botany*, 71(1), 63-72.
[0.1093/jxb/erz395](https://doi.org/10.1093/jxb/erz395)
- Singh, M., Rathore, M. S., Choudhary, K., & Shekhawat, N. S. (2009). Direct shoot bud formation and tuberization from aseptically cultured root tubers of calla lily (Zantedeschia aethiopica L). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(2), 203-207. <https://doi.org/10.1007/BF03263320>
- Snijder, R. C., & van Tuyl, J. M. (2002). Evaluation of tests to determine resistance of Zantedeschia spp. (Araceae) to soft rot caused by Erwinia carotovora subsp. carotovora. *European Journal of Plant Pathology*, 108(6), 565-571.
[0.1023/A:1019973219999](https://doi.org/10.1023/A:1019973219999)
- Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) www.siap.gob. Consultado en mayo, 2020.
- Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Franczuk, M., Jońca, J., Wielgomas, B., Mikicinski A., Popovic T., & Waleron, K. (2019). Pectobacterium zantedeschiae sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (Zantedeschia spp.). *Systematic and Applied Microbiology*, 42(3), 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.08.004>

- Wei, Z., Zhang, H., Wang, Y., Li, Y., Xiong, M., Wang, X., & Zhou, D. (2017). Assessing genetic diversity and population differentiation of colored Calla Lily (*Zantedeschia* Hybrid) for an efficient breeding program. *Genes* 8(6), 168. <https://doi.org/10.3390/genes8060168>
- Weiyang, W., Hui, Z., Jiangbo, L., & Yimin, D. (2012). Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Zantedeschia hybrida* 'Gaoyuan'. *Journal of Agriculture*, 2, 42-45.
- Wolf, J. M., Boer, S. H. D., Czajkowski, R., Cahill, G., Gijsegem, F. V., Davey, T., ... & Waals, J. E. (2021). Management of diseases caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. In *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium species* (pp. 175-214). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_6
- Xiao-chun, S. H. U. (2010). Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Zantedeschia hybrida* 'Feng Yan'. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 26, http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY201026032.htm
- Yang, K., Wang, L., Le, J., & Dong, J. (2020). Cell polarity: Regulators and mechanisms in plants. *Journal of integrative plant biology*, 62(1), 132-147. <https://doi.org/10.1111/jipb.12904>

3. CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)

RESUMEN

En la actualidad la producción global de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) se ha visto mermada por la presencia de diversas enfermedades entre las que se destacan, la pudrición blanda, propiciada principalmente por bacterias del género *Pectobacterium*. Esta enfermedad también impacta en el cultivo de tejidos por lo que se condujeron una serie de ensayos para diseñar un protocolo de control de microorganismos patógenos con base en la detección e identificación de hongos, bacterias y virus. Se realizaron nueve bioensayos en el establecimiento aséptico de explantes de los cultivares Deja vú y Utopía con diferentes niveles de desinfectantes y antibióticos para tres tipos de explante provenientes del rizoma, dos de los cuáles se establecieron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial. El primer diseño consistió en pretratamientos como agrimicyn (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}), kasugamicina (1.5 ml L^{-1}) y agua caliente (50°C) para explantes de región basal de rizoma (Rb), región terminal de rizoma (Rt) y yemas adventicias (Y) mientras que en el segundo diseño los tratamientos se basaron en la aplicación de Plant Preservative Mixture® (PPM) (2.5%, 5% y 6%), Nitrato de plata (80 mg L^{-1}) y agrimicyn (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}) únicamente para yemas adventicias. Se realizó un análisis de la varianza no paramétrica con la prueba de Kruskal y Wallis para los datos con distribución binomial y una prueba de comparación de media Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados mostraron que agrimicyn (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}) redujo en un 100% la contaminación endófitas por hongos y bacterias ($P \leq 0.05$) en explantes provenientes de rizoma para los cultivares Deja vú y Utopía.

Palabras clave: *Pectobacterium*, pudrición blanda, 'Deja vú', 'Utopía'

CONTROL OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN CALLA LILY (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) TISSUE CULTURE

ABSTRACT

Currently, the global production of calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) has been decreased by presence of several diseases, among them soft rot highlights, caused mainly by bacteria of the genus *Pectobacterium*. This disease impact on the tissue culture too, so a series of tests were conducted to design a protocol for the control of pathogenic microorganisms based on the detection and identification of fungi, bacteria and viruses. Nine bioassays were conducted in the aseptic establishment of explants of the cultivars "Deja vu" and "Utopia" with different levels of disinfectants and antibiotics for three types of explants from the rhizome, two of them were established with a completely randomized design with factorial arrangement. The first design consisted of pretreatments such as Agrimycin (2 g L^{-1}) + Benomyl (2 g L^{-1}), Kasugamycin (1.5 ml L^{-1}) and hot water (50°C) for explants from rhizome basal region (Rb), rhizome terminal region (Rt) and adventitious buds (Y), in the second design the treatments were based on the application of Plant Preservative Mixture® (PPM) (2.5%, 5% and 6%), Silver Nitrate (80 mg L^{-1}) and Agrimycin (2 g L^{-1}) + Benomyl (2 g L^{-1}) for adventitious buds only. A nonparametric analysis of variance was performed with the Kruskal and Wallis test for data with binomial distribution and a Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$). The results showed that Agrimycin (2 g L^{-1}) + Benomyl (2 g L^{-1}) reduced fungal and bacterial endophytic contamination by 100% ($p \leq 0.05$) in explants from rhizome for the cultivars 'Deja vu' and 'Utopia'.

Key words: *Pectobacterium*, soft rot, 'Deja vú', 'Utopía'

3.1 Introducción

El alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L) Spreng), es una planta ornamental originaria de África, forma parte de la familia Araceae y es una de las flores más apreciadas (Nery et al., 2015), sin embargo, la producción se ha visto mermada por patógenos asociados a la pudrición blanda. Gracias a la detección e identificación de patógenos se sabe que los causantes de esta enfermedad abarcan una amplia gama de microorganismos que incluyen en el caso de las bacterias a *Pectobacterium carotovorum* sbps *carotovorum* principalmente (Wright, 1998), *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas putida* (Krejzar, et al., 2008), *Pseudomonas veronii*, *Chriseobacterium indologenes* (Mikiciński et al., 2010), *Xanthomonas campestris* pv *zantedeschiae* (Joubert & Truter, 1972), *Pectobacterium chrysantemi* (Lee., Chen & Chang, 2002), *Pectobacterium zantedeschiae* (Waleron et al., 2019) y a *Pectobacterium aroidearum* (Chen, Lin, & Huang, 2020), en cuanto a hongos se han asociado *Phytophthora spp* (Paredes, 2006), *Rhizoctonia*, *Phytium* (Wright, 1998), *Fusarium oxisporum* y *Fusarium solani* (Ciampi et al., 2009), los síntomas de esta enfermedad comienzan con un escaso crecimiento, amarillamiento en hojas, lesiones acuosas que aparecen en el rizoma y en la base de los tallos, si la enfermedad progresa, el tejido del rizoma comienza a tomar un aspecto macerado, las hojas y espata finalmente colapsan y la planta completa muere (Wright, 1998).

Las especies del género *Zantedeschia* también son hospederos de virus como el virus del mosaico de la calabaza (CMV) (Mokra & Götzová 1992), virus del mosaico de konjac (KoMV), virus de mosaico amarillo del frijol (Pham, Langeveld, Lemmers & Derks, 2000), virus de mosaico de *Zantedeschia* (ZaMV) (Kwon, Ha, Yoon & Ryu, 2002), el virus del moteado del clavel (CarMV), virus del mosaico del nabo (TuMV), virus moteado plateado de la sandía (WSMoV) y virus Dasheen (DsMV) (Chen, Ko, Lin, Jan & Hsu 2003) y el virus del mosaico suave de *Zantedeschia* (ZaMMV) (Rizzo et al., 2015).

Debido a los daños causados por pudriciones del rizoma se registraron pérdidas a nivel mundial hasta del 100 % en campo durante la década de 1980 (Vanneste,

1996 en Mikiciński et al., 2010), mientras que en México se determinó que en Veracruz existen zonas de producción contaminadas con bacterias causantes de esta enfermedad cuyas pérdidas fueron del 90 % por lo que el cultivo se consideró en estado crítico (García López, 2010). Para Veracruz, la horticultura ornamental es una actividad que se realiza para más de 40 especies en 19 municipios (González, Espinoza & Torres, 2007). Dada la alta infección de plantas debido principalmente a *Pectobacterium carotovorum* el cultivo de tejidos se vislumbró como una vía adecuada para obtener clones libres de enfermedades (Chen et al., 2000).

Las primeras etapas del cultivo de tejidos son cruciales para el control de los microorganismos patógenos, sin embargo, hasta el momento no hay métodos efectivos para controlar la contaminación endófito causada por bacterias de la familia *Pectobacteriaceae* (Wolf et al., 2021). Por esto, se planteó el presente estudio cuyo objetivo fue determinar un esquema óptimo de control de microorganismos patógenos en cultivo *in vitro* de los cultivares de alcatraz o arum lily ‘Utopía’ y ‘Deja vú’ (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) con base en el diagnóstico fitosanitario previo al establecimiento.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Ubicación de la fase experimental

Esta investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, y el manejo del material donante se realizó en el invernadero del laboratorio.

3.2.2. Material vegetal

Se utilizaron los cultivares Deja vú (Cruz-Castillo & Torres, 2017), Utopía (Cruz-Castillo, 2022), Selección 1 y Selección 2 pertenecientes a la especie *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng como fuente de explante. El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo, profesor investigador

del Centro Regional Universitario de Oriente (CRUO) de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.3. Detección de microorganismos patógenos y virus

Se seleccionó una planta de cada selección de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng); 'Utopía', 'Deja vú', 'Selección 1' y 'Selección 2', con síntomas de amarillamiento en hojas y pudrición en la periferia del rizoma, estas plantas fueron llevadas al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Posgraduados campus Montecillo, para la detección e identificación de hongos, bacterias y virus.

3.2.4. Etapa 0: Manejo de la planta donante.

Se recibieron cuatro plantas de cada selección de alcatraz y se mantuvieron en vivero durante seis meses en los que se ejecutó un programa de manejo fitosanitario previo al cultivo *in vitro* (Cuadro 6). Cada aplicación se realizó nivelando el pH del agua a 5.5 con la ayuda de un potenciómetro digital portátil a prueba de agua marca Hanna® previamente calibrado, en todas las aplicaciones se añadió Inex-A® como surfactante. Se procuró que el pH final estuviera en un rango de 5.5 a 6.5.

Cuadro 6. Programa de manejo fitosanitario en plantas de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) previo al cultivo de tejidos

Producto	Ingrediente activo	Enfermedad o plaga	Dosis	Forma de aplicación	Frecuencia de aplicación
Agrimicyn	Estreptomicina + Oxitetraciclina	Pudrición blanda	2 g L ⁻¹	En el riego	2 veces por semana
Beleaf	Flonicamid	Pulgón Trips	0.5 g L ⁻¹	Aspersión foliar	1 vez por semana

Las plantas se trasplantaron a un sustrato inerte compuesto de peat moss y agrolita a una proporción 2:1, respectivamente. Durante el manejo de la planta en vivero se observó síntomas de pudrición del rizoma que comenzó con amarillamiento en las hojas jóvenes, escaso crecimiento de las espatas y deficiente apertura que culminó en marchitamiento, los peciolo se volvieron acuosos en la base de la planta y finalmente la planta completa colapsó por lo que el diagnóstico fitosanitario previo al cultivo de tejidos cobró mayor importancia.

3.2.5. Etapa 1: Estrategias de control de microorganismos fitopatógenos en el establecimiento

Se realizó una serie de bioensayos enfocados en el control de hongos y posibles bacterias sistémicas, los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. En los bioensayos 1-7 se utilizó la variedad Deja vú como fuente de explante ya que se contaba con la mayor cantidad de plantas, mientras que en los bioensayos 8 y 9 se seleccionaron plantas tanto del cultivar Deja vú como Utopía. Las variables que se observaron fueron las tasas de contaminación por hongos y bacterias. Para diferenciar los (hongos y bacterias), se tomaron como características generales la presencia de micelio para el caso de hongos, y pudrición acuosa del tejido con olor fétido para bacterias.

Los resultados de los primeros siete bioensayos se analizaron con el paquete estadístico Excel[®] 2010 y se obtuvieron porcentajes de contaminación por hongos y bacterias en tejido de yemas (Y), región basal (Rb) y región terminal (Rt) al ser incubados bajo luz y oscuridad.

3.2.6. Medio de cultivo

En todos los bioensayos se utilizó un medio de cultivo básico compuesto de sales Murashige y Skoog (MS) al 100 %, 0.40 mg L⁻¹ de mioinosito, 60 mg L⁻¹ de L-cisteína, 5.2 g L⁻¹ de Phytigel[®] y 3 % de sacarosa. Se ajustó el pH a 5.7 ± 0.1.

La esterilización se realizó en autoclave a 120 °C de temperatura y 15 kg cm² durante 20 minutos.

3.3. Establecimiento aséptico

3.3.1. Bioensayo 1

Se uso de un esquema básico de desinfestación para tres tipos de explante del cultivar Deja vú: yemas de rizoma (Y), segmentos de región basal (Rb) (abaxial) y región terminal (Rt) (adaxial) de la parte medular del rizoma (Figura 2). Se escogieron plantas visualmente sanas, de seis meses de edad, es decir, en etapa vegetativa, el primer paso consistió en retirar las hojas y raíces con un bisturí seguido de un lavado vigoroso con detergente + Tween 20 y agua corriente y se disectaron las partes vegetales ya mencionadas. En la cámara de flujo laminar, los explantes se sumergieron en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante un minuto seguido de inmersión en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % (v/v) 15 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua estéril. El tejido medular aislado se disectó en explantes de 0.5 cm de diámetro y 0.5 de largo, en total se obtuvieron 40 explantes de Rb, 20 de Rt y 20 yemas los cuales se establecieron en frascos Gerber ® (3-5 explantes por frasco). Los explante sembrados se distribuyeron de la siguiente manera; 13 provenientes de Rb, 10 de Rt y 10 yemas se colocaron bajo luz con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, en tanto, 14 explantes de Rb en oscuridad, 10 de Rt y 10 yemas estuvieron totalmente en oscuridad. El periodo de evaluación de la contaminación fue de siete días después del establecimiento (DDE). Las muestras se distribuyeron en un diseño completamente al azar.

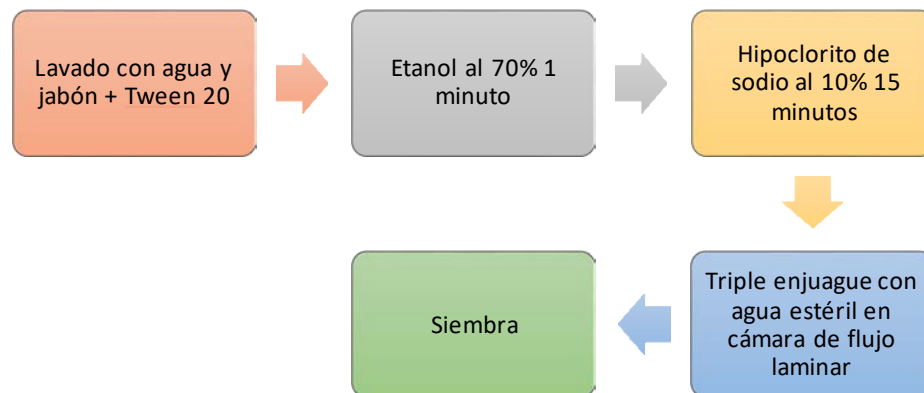


Figura 2. Esquema de desinfestación del primer bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.2. Bioensayo 2

En este bioensayo, se utilizó un diseño completamente al azar. Se utilizó Captan 50 WP[®] (I. A. carboxamida) al 4 % como fungicida sistémico y se cambió el NaOCl por hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) al 2 % (Figura 3), los esquemas de desinfestación se aplicaron a las yemas mientras que explantes de Rb y Rt se trataron con el primer esquema. Se generaron 19 explantes de Rb, 10 de Rt y 16 yemas, para Rb y Rt el tamaño de los explantes fue de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de largo. Los explantes se establecieron en tubos de ensayo, cada tubo se consideró como una unidad experimental. Las yemas disectadas se dejaron en la solución con Captan en el agitador durante 12 horas, posteriormente, en la cámara de flujo laminar los explantes se sumergieron en la solución de etanol al 70 % (v/v) durante un minuto seguido de inmersión en hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) al 4 % (p/v) 15 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua estéril. Se incubaron 9 unidades experimentales de Rb, 5 de Rt y 8 yemas bajo un fotoperiodo de 16 horas luz/8 de oscuridad y en completa oscuridad se incubaron 10 unidades de Rb, 5 de Rt y 8 yemas.

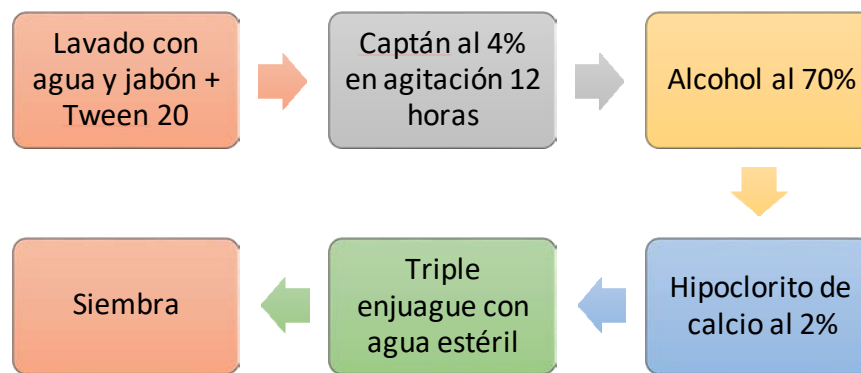


Figura 3. Esquema de desinfestación del segundo bioensayo para yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.3. Bioensayo 3

En el bioensayo 3 (Figura 4), los esquemas de desinfestación se aplicaron únicamente a las yemas, para explantes de Rb y Rt el esquema que se utilizó fue el del bioensayo 2. En total se disectaron 41 explantes de Rb de 0.5 cm de diámetro y 0.5 de largo, 24 de Rt, 46 yemas las cuales se establecieron con un diseño completamente al azar. Los explantes se sumergieron en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante un minuto seguido de inmersión en Hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) al 4 % (p/v) 15 minutos y después se dejaron en la solución con Captan en el agitador durante 12 horas y ya en la cámara de flujo laminar se procedió al triple enjuague. Cada yema se estableció en un tubo de ensaye, la mitad de las muestras se incubaron en la oscuridad y el resto se mantuvo en iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

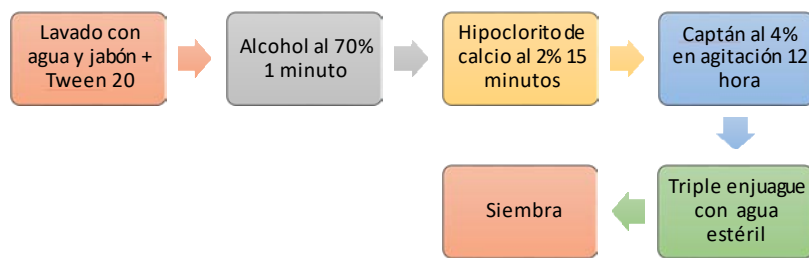


Figura 4. Esquema de desinfestación del tercer bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.4. Bioensayo 4

En el bioensayo 4 se involucró el uso de Agrimycin® (I.A. estreptomicina al 2.19 % + oxitetraciclina al 0.235 %), los tejidos de Rb, Rt y Y pasaron primero por la solución de etanol al 70 % (v/v) durante un minuto seguido de inmersión en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 10 % (v/v) 15 minutos seguido del triple enjuague en la cámara de flujo laminar (Figura 5). Este establecimiento se realizó con un diseño completo al azar. La mitad de las muestras se incubaron en la oscuridad y el resto se mantuvo en iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

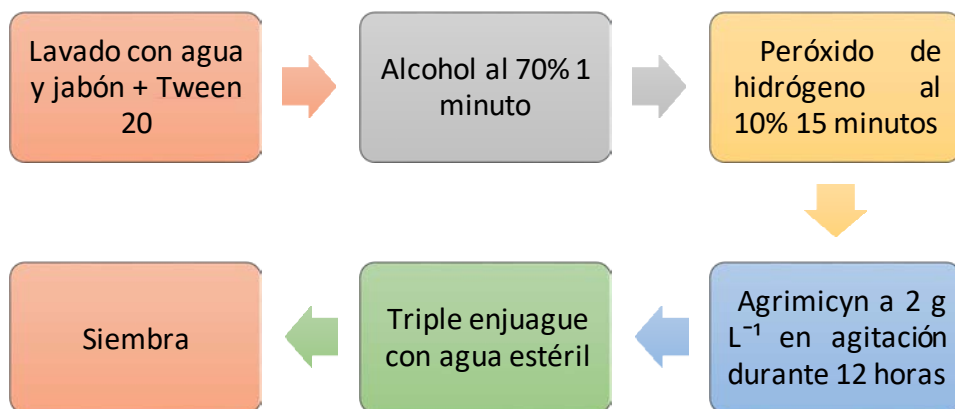


Figura 5. Esquema de desinfestación del cuarto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.5. Bioensayo 5

Para este bioensayo, se añadió un antibiótico en medio de cultivo con la finalidad de eliminar bacterias endófitas en el tejido, se preparó un medio MS (Murashige & Skoog) al 4.3 %, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 60 mg L⁻¹ de L- cisteína, sacarosa al 3 % y 5.2 g L⁻¹ de Phytigel®. El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.01 y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120°C y una presión de 15 kg cm² durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo de esterilización, se agregó 80 mg L⁻¹ (p/v) de Bactrim (I. A. sulfametoxazol), para esto, el antibiótico se disolvió en agua estéril y se filtró en el medio con un filtro milipore de 0.22 µ, finalmente se sirvió 20 ml de medio en tubos de ensayo.

En total se obtuvieron los siguientes explantes: 12 segmentos de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de largo provenientes de Rb, 15 de Rt con las mismas dimensiones y 13 yemas, la siembra se estableció con un diseño completamente al azar. Los explantes disectados pasaron primero por la solución de etanol al 70 % (v/v) durante un minuto seguido de inmersión en Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10 % (v/v) durante 15 minutos, y se sembró en el medio con antibiótico en el cuál permanecieron 24 horas (Figura 6). Posteriormente, se traspasaron en el medio sin reguladores de crecimiento. Se estableció un explante por tubo de ensayo, cada tubo representó una unidad experimental, 6 unidades de tejido de Rb, 8 de Rt y 7 de yemas se incubaron en iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y el resto de las muestras se colocaron en completa oscuridad.

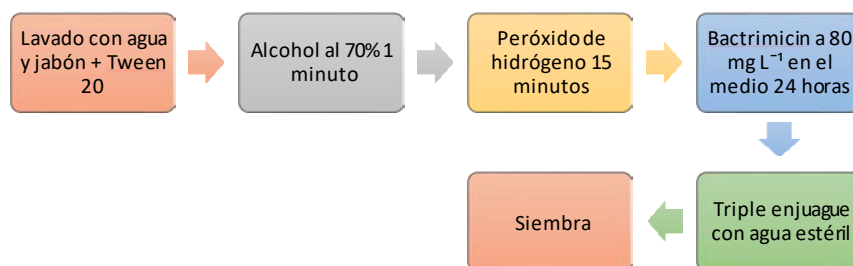


Figura 6. Esquema de desinfestación del quinto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.6. Bioensayo 6

En este bioensayo los explantes se sumergieron en etanol al 70 % durante un minuto seguido de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ al 2 % (p/v) durante 15 minutos, después se colocaron en baño de agua caliente a 50°C durante 10 minutos, una modificación del método utilizado por Hashemidehkordi et al. (2021), la temperatura se controló con un termómetro digital marca Waterproof® (Figura 7). Al final de la siembra se obtuvieron 20 explantes de la región basal (Rb), 20 de la región terminal (Rt) y 14 yemas (Y), de estos, 10 explantes de Rb, 10 de Rt y 7 yemas se incubaron bajo iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad mientras que el resto se dejó completamente en la oscuridad. El diseño utilizado fue completamente al azar.

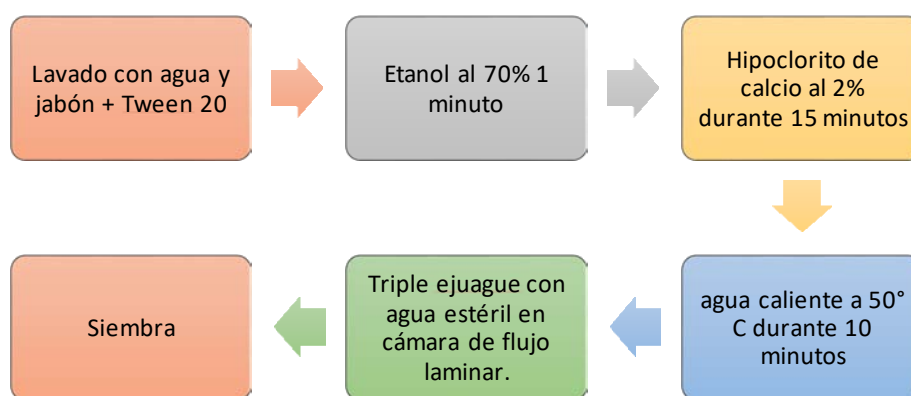


Figura 7. Esquema de desinfestación del sexto bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng

3.3.7. Bioensayo 7

Se aplicó la misma modificación del método empleado por Hashemidehkordi et al. (2021) pero difiere del bioensayo 6 en el orden de los pasos, primero los explantes pasaron por el baño de agua caliente y después por el Etanol y el $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (Figura 8). Se obtuvieron 20 explantes de la región basal (Rb), 20 de la región terminal (Rt) y 14 yemas (Y), de estos, 10 explantes de Rb, 10 de Rt y 7 yemas dispuestas completamente al azar. Se incubaron bajo iluminación con un

fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad mientras que el resto se dejó completamente en la oscuridad.

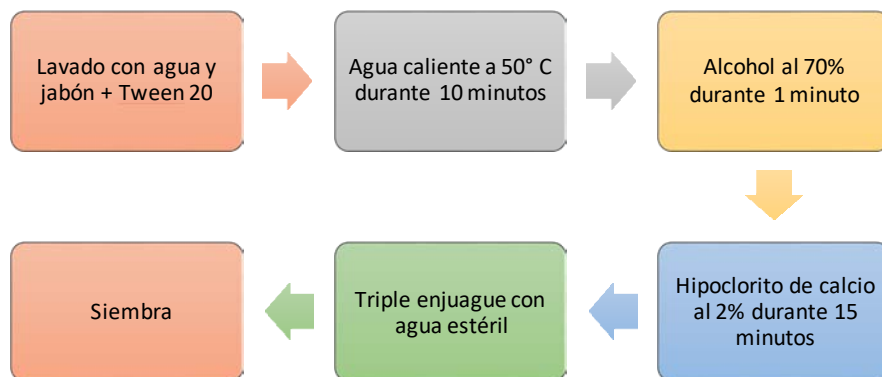


Figura 8. Esquema de desinfestación del séptimo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.8. Bioensayo 8

Se seleccionaron únicamente explantes de los cultivares Utopía y Deja vú, los tejidos de yemas (Y), región basal (Rb) y región terminal (RT) del rizoma se lavaron con agua y jabón + Tween 20 ®, en este ensayo se utilizaron 18 tratamientos que involucraron la aplicación de agrimycin ® (2 g L⁻¹) + benomilo ® (2 g L⁻¹) como bactericida y fungicida respectivamente (Figura 9), agua caliente al inicio del tratamiento, pero con una disminución de 10°C para evitar el necrosamiento del tejido de RT por efecto del calor (Figura 10) y se implementó Kasugamicina®, un bactericida biológico derivado de *Streptomyces kasugaensis* (Figura 11) que no ha sido evaluado en el cultivo *in vitro* del alcatraz.

El ensayo se estableció con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de tres factores, tres niveles para el factor cultivar, tres niveles para el factor Método de control de contaminantes y dos niveles para el factor explante, dando como resultado 18 tratamientos con 6 repeticiones, es decir, 108 unidades experimentales, cada unidad consistió en un tubo de ensaye con un explante de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de largo en el caso de Rb y Rt. En el cuadro 7 se muestran los tratamientos empleados en este ensayo. Las

muestras permanecieron únicamente bajo iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Infostat ®, un análisis Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y una prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 7. Tratamientos aplicados en el octavo bioensayo de control de patógenos en el establecimiento de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Tratamiento	Cultivar	Método de control de contaminantes	Explante
T1	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rb
T2	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rt
T3	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Yemas
T4	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rb
T5	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rt
T6	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Yemas
T7	Deja vú	Baño de agua caliente (40°C)	Rb
T8	Deja vú	Baño de agua caliente (40°C)	Rt
T9	Deja vú	Baño de agua caliente (40°C)	Yemas
T10	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo	Rb
T11	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rt

T12	Utopía	Agrimicyn (2 g L^{-1}) + Benomilo (2 g L^{-1})	Yemas
T13	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L^{-1})	Rb
T14	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L^{-1})	Rt
T15	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L^{-1})	Yemas
T16	Utopía	Baño de agua caliente (40°C)	Rb
T17	Utopía	Baño de agua caliente (40°C)	Rt
T18	Utopía	Baño de agua caliente (40°C)	Yemas

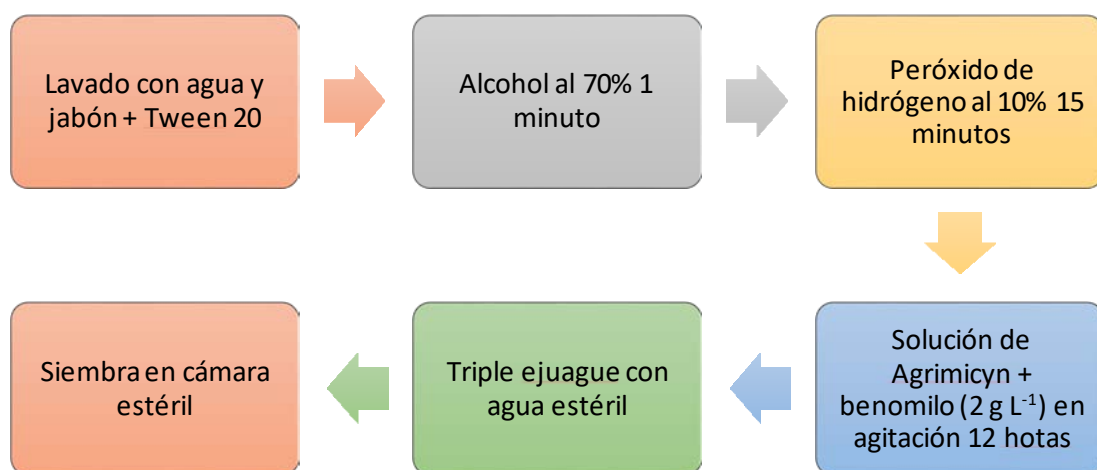


Figura 9. Esquema de desinfestación con Agrimicyn (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

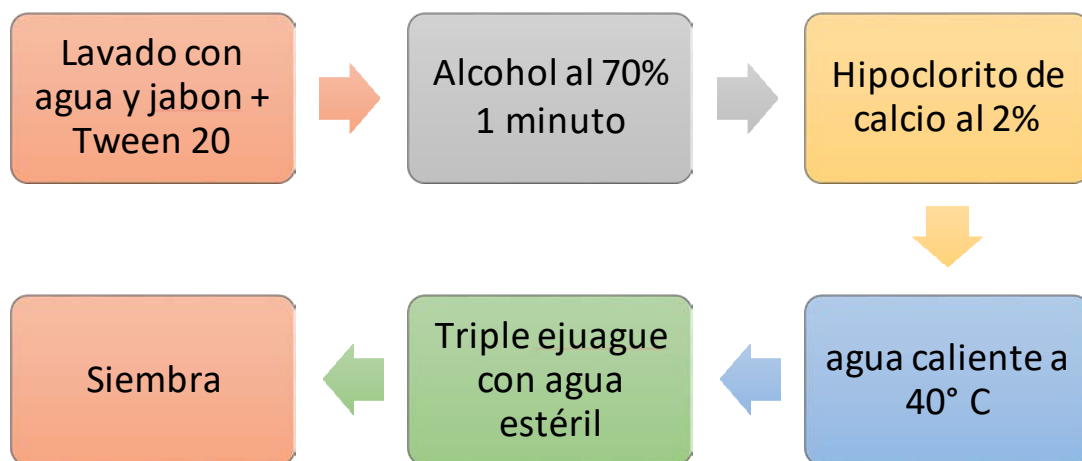


Figura 10. Esquema de desinfección con agua caliente (40 °C) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

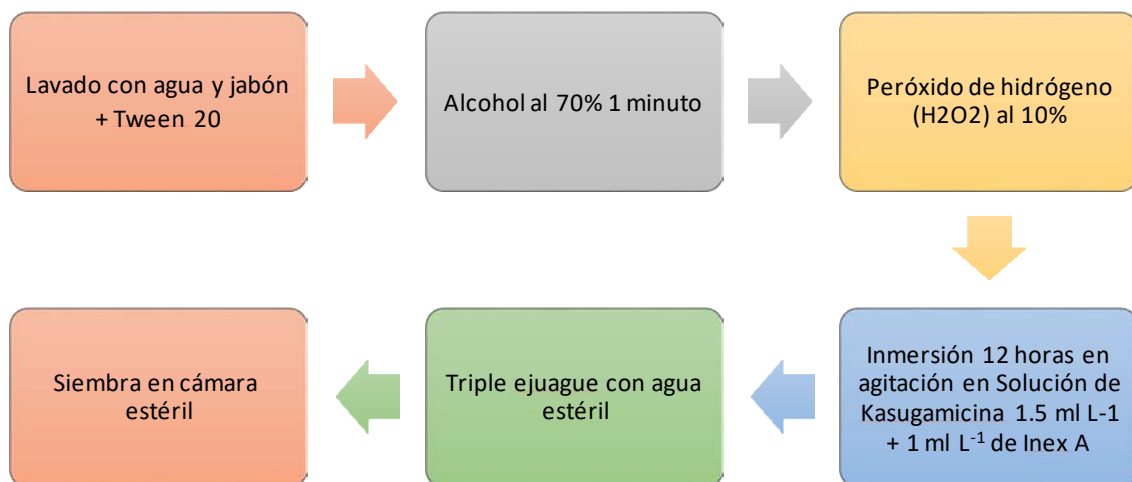


Figura 11. Esquema de desinfección con kasugamicina (1.5 ml L-1) del octavo bioensayo para explantes de Región terminal (Rt), Región basal (Rb) y Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.3.9. Bioensayo 9

Para el último ensayo las estrategias se basaron en el uso de Plant Preservative Mixture™ (PPM) (Figura 12), un agente para el control de la contaminación causada por bacterias sistémicas utilizado con éxito en el cultivo *in vitro* para la

erradicación de *Sphingomonas paucimobilis* en *Petunia hybrida* (Miyazaki, Tan & Errington, 2010), Agrimicyn en sinergia con benomilo (benlate) para disminuir la contaminación endófitas de yemas (Y) de los cultivares Utopía y Deja vú (Figura 13) además de nitrato de plata AgNO_3 con modificaciones del método de Mori, Kubo, Mimura y Yamaguchi (1999) (Figura 14), se adicionó Inex A ® (1 ml L^{-1}) como surfactante para mejorar la dispersión de los productos en el tejido vegetal a los tratamientos con Nitrato de plata y Agrimicyn (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}).

El ensayo se estableció con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2 factores; cultivar como primer factor con dos niveles y como segundo factor el método de control de contaminantes con cinco niveles, es decir, 10 tratamientos con 5 repeticiones, dando como resultado 50 unidades experimentales, cada unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un explante de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de largo, los tratamientos aplicados se resumen en el cuadro 8. Al igual que en el bioensayo 7, las muestras permanecieron únicamente bajo iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Los datos de la variable “tasa de contaminación” se analizaron con el paquete estadístico Infostat ® , se realizó un análisis Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 8. Tratamientos aplicados en el noveno bioensayo de control de patógenos en el establecimiento de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Tratamiento	Cultivar	Método de control de contaminantes	Dosis
T1	Utopía	PPM	2.5 %
T2	Utopía	PPM	5 %
T3	Utopía	PPM	6 %
T4	Deja vú	PPM	2.5 %
T5	Deja vú	PPM	5 %
T6	Deja vú	PPM	6 %

T7	Utopía	Agrimicyn Benomilo	+ 2 g L ⁻¹
T8	Utopía	Nitrato de plata	80 mg L ⁻¹
T9	Deja vú	Agrimicyn Benomilo	+ 2 g L ⁻¹
T10	Deja vú	Nitrato de plata	80 mg L ⁻¹

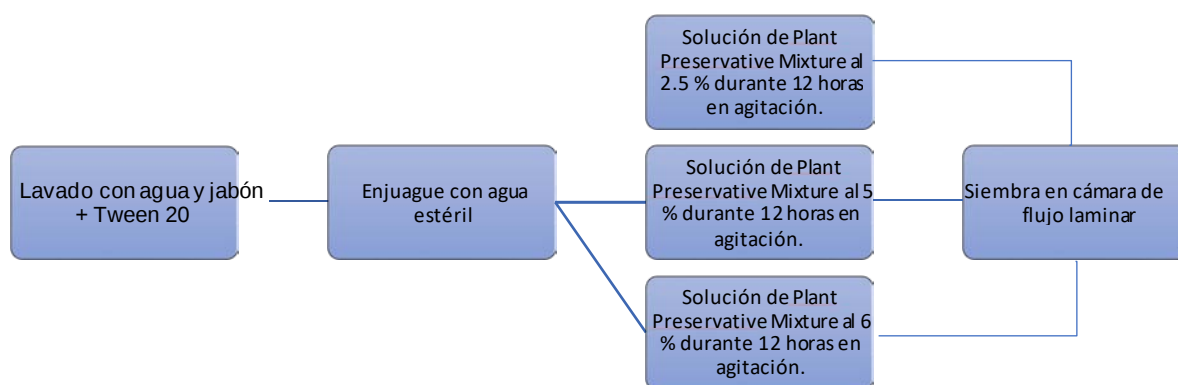


Figura 12. Esquema de desinfestación con Plant Preservative Mixture® (PPM) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

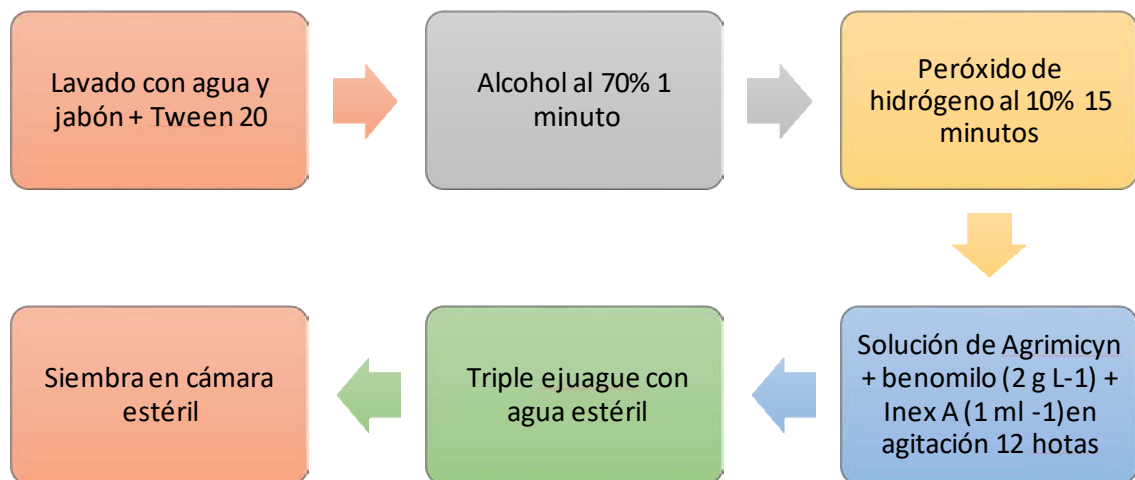


Figura 13. Esquema de desinfestación con Agrimicyn (2 g L⁻¹) + Benomilo (2 g L⁻¹) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

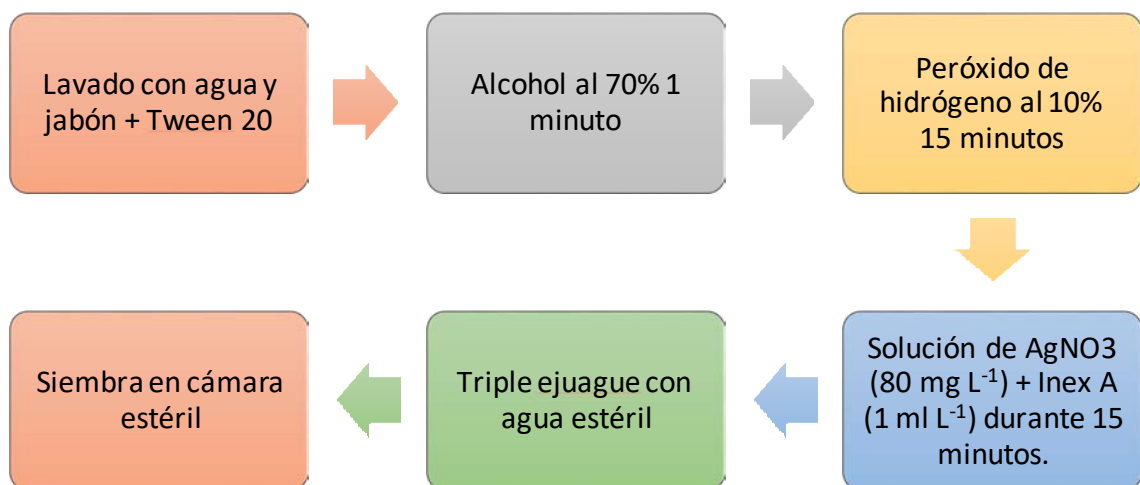


Figura 14. Esquema de desinfestación con Nitrato de plata (80 mg L⁻¹) del noveno bioensayo para Yemas (Y) de rizoma pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Diagnóstico fitosanitario

En rizomas con síntomas de pudrición, los análisis de laboratorio arrojaron la presencia de *Fusarium solani* y *Alternaria* sp en el cultivar Utopía, *Fusarium oxysporum* en ‘Deja vú’, en la ‘Selección 1’ se detectó *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp y *Alternaria* sp; finalmente en la ‘Selección 2’ se encontró a *Phytium*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp y *Rhizopus* sp, estos datos se

concentran en el cuadro 9. En los resultados del diagnóstico no se reveló la presencia de bacterias fitopatógenas ni de virus relacionados con enfermedades del alcatraz. Especies del género *Alternaria* y *Rhizoctonia* son considerados endógenos por lo que pueden persistir en el cultivo de tejidos de alcatraz (Kritzing et al., 1997).

Cuadro 9. Resultados de diagnóstico fitosanitario para la detección de hongos, bacterias y virus en cuatro selecciones de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)

Microorganismo o virus	Material vegetal			
	Utopía	Deja vú	Selección 1	Selección 2
Hongos	<i>Fusarium solani</i> <i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria sp</i> <i>Rhizoctonia sp</i>	<i>Phytium</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria sp</i> <i>Rhizopus sp</i>
Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Tospovirus	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Potyvirus	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cucumber Mosaic virus (CMV)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Detección e identificación para hongos y bacterias mediante claves taxonómicas en productos y subproductos vegetales IT-MIC-01, detección de virus mediante técnicas moleculares. Fuente: Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Posgraduados campus Montecillos.

3.4.2. Establecimiento aséptico

En las muestras de Rt incubadas bajo luz (Figura 15) no se presentó contaminación por hongos en ninguno de los métodos utilizados mientras que en las muestras incubadas en la oscuridad (Figura 16) en el cuarto bioensayo se presentó el 20 % de contaminación por hongos en el que se utilizó además del alcohol, peróxido de hidrógeno y Agrimicyn a 2 g L^{-1} en agitación durante 12 horas, sin embargo, los tejidos no contaminados presentaron 100 % de necrosis 15 días después de establecimiento. Los explantes provenientes de Rb presentaron resultados similares, los explantes incubados en la luz tuvieron un bajo porcentaje de contaminación con el primer esquema de desinfestación y cuando se incubaron en la oscuridad las muestras tratadas con el cuarto esquema se obtuvo el 20 % de hongos al igual que en la Rt. En general, las yemas presentaron mayor contaminación por hongos posiblemente a que estuvieron en contacto directo con el sustrato de invernadero.

En la incubación con luz se logró disminuir la incidencia de hongos en cada experimento, los dos últimos experimentos que lograron los porcentajes más bajos consistieron en el uso de agua caliente posterior al uso de alcohol al 70 % seguido de hipoclorito de calcio al 2 % (Bioensayo 6) y previo a este paso (Bioensayo 7).

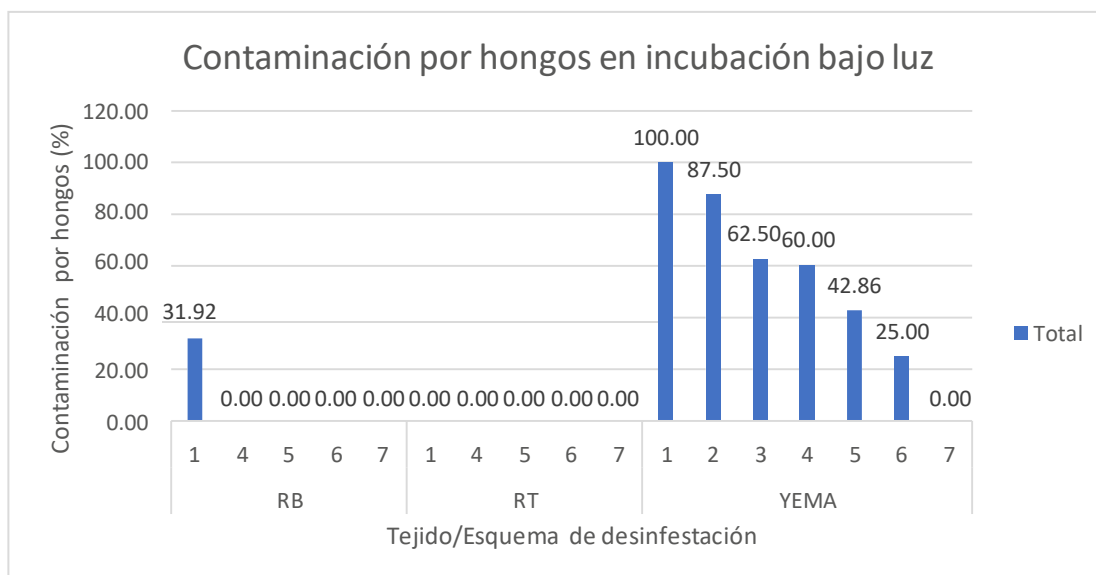


Figura 15. Porcentaje de contaminación por hongos en muestras de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas incubadas en luz a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

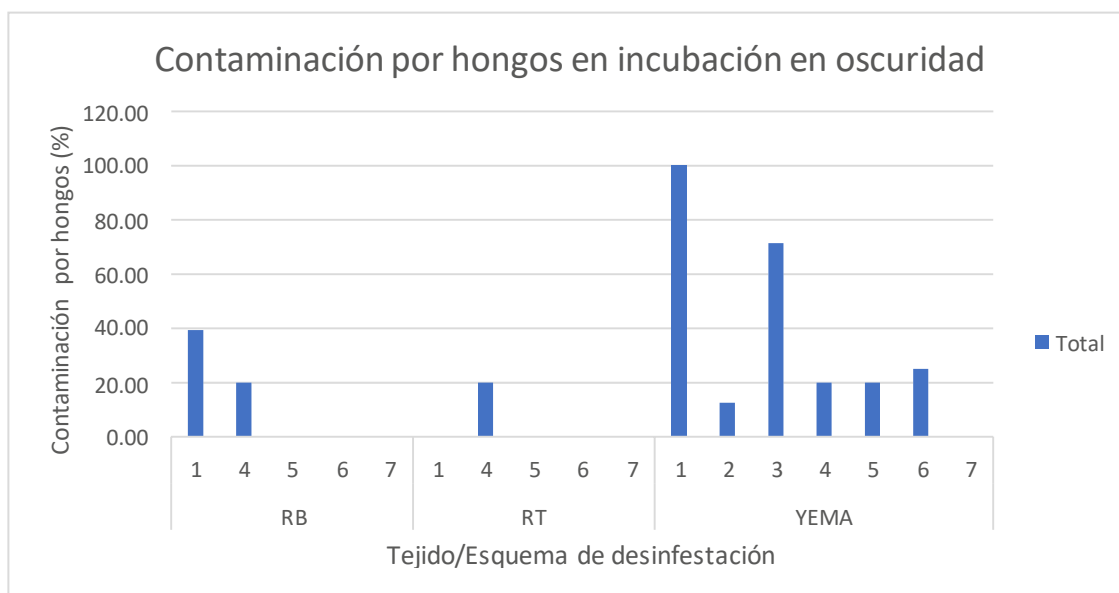


Figura 16. Porcentaje de contaminación por hongos en muestras de de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas incubadas en oscuridad a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

La contaminación por bacterias (Figura 17) tuvo mayores porcentajes de incidencia tanto en las muestras incubadas bajo luz como en oscuridad (Figura 18), para el tejido medular tanto de Rb como Rt el tratamiento con baño caliente resultó con 0 % de incidencia en ambas condiciones de incubación, empero, se observó 100 % de necrosis principalmente en Rt. En iluminación, las muestras de Rb tratadas con Agrimycin a 2 g L^{-1} tuvieron una incidencia de contaminación bacteriana del 20 % mientras que en la incubación en la oscuridad se incrementó al 60 %, por el contrario, se observó que con el bioensayo 5 correspondiente a la adición de sulfametoxazol al medio de cultivo la incidencia fue del 16.67 % para los explantes incubados en la oscuridad, pero el 50 % de las colocadas bajo luz presentaron crecimiento bacteriano. En cuanto a las yemas, en la incubación con luz se obtuvo 0 % de contaminación con dos esquemas; Captán al 4 % en agitación 12 horas previo al tratamiento con alcohol al 70 % durante 1 minuto e hipoclorito de calcio al 2 % durante 15 minutos y alcohol al 70 % durante 1 minuto seguido de peróxido de hidrógeno al 10 % durante 15 minutos y finalmente Agrimycin 2 g L^{-1} en agitación. Cabe recalcar que en el caso de las yemas tratadas con agua caliente el porcentaje de infección fue $\geq 50 \%$ en contraste con el tejido de Rt y Rb que presentaron menor porcentaje de contaminación.

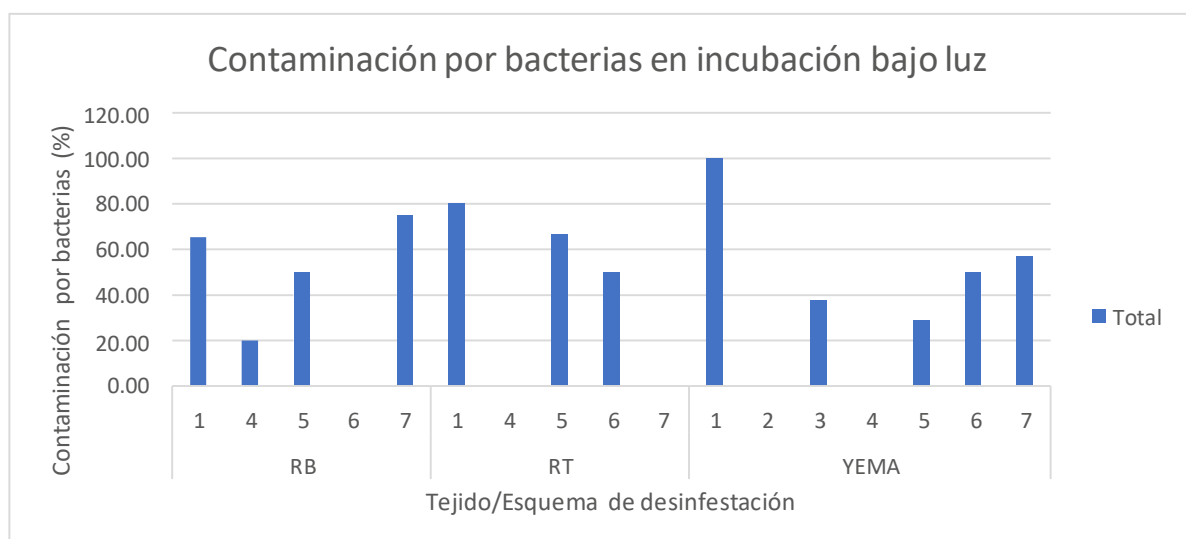


Figura 17. Porcentaje de contaminación por bacterias en muestras de Rb(Región basal), Rt (Región terminal) y yemas (Y) incubadas en luz a los 8 días

después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

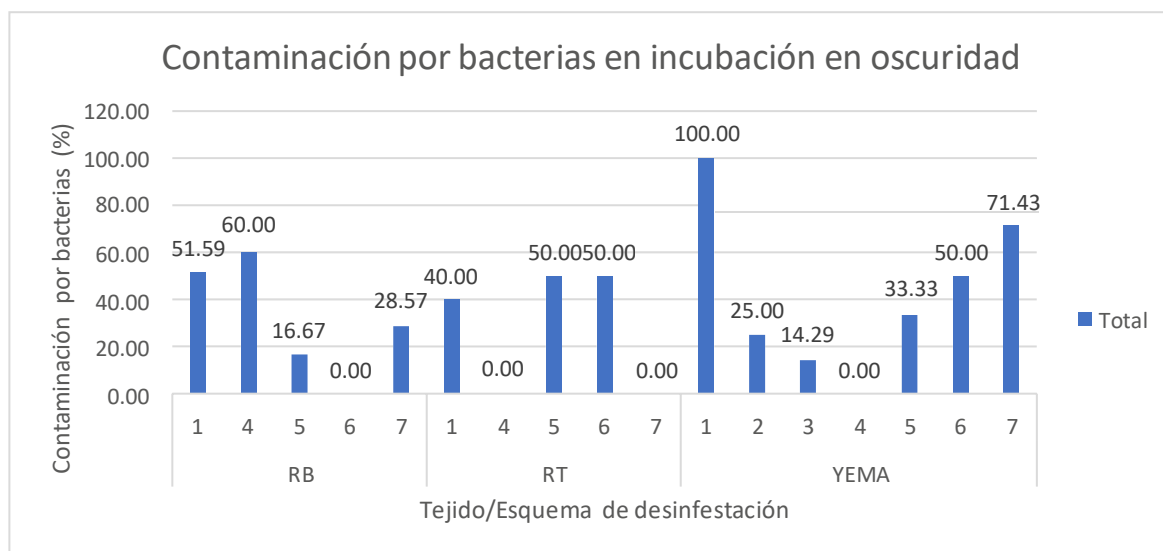


Figura 18. Porcentaje de contaminación por bacterias en muestras de Rb(Región basal), Rt (Región terminal) y yemas (Y) incubadas en oscuridad a los 8 días después del establecimiento de los siete bioensayos para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Ensayo 8

Los resultados de este ensayo demostraron que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos aplicados sobre la tasa de contaminación tanto por hongos como bacterias, los tratamientos con Agrimycin (2 g L^{-1}) + benomilo (2 g L^{-1}) tejido de Rb para Deja vú (T1) y Utopía (T10) redujeron considerablemente la tasa de contaminación mientras que con agua caliente a 40°C se obtuvieron tasas de contaminación mayores a las reportadas por Hashemidehkordi et al. (2021) en tejido de rizoma con tratamiento en baño caliente a 45°C durante 35 minutos. En general, la kasugamicina (1.5 ml L^{-1}) no resultó efectiva para el control de la contaminación, excepto para explantes de Rt en Utopía, este es primer reporte acerca del uso de este producto en el cultivo de tejidos de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de los tratamientos sobre la tasa de contaminación en el establecimiento *in vitro* de los cultivares Deja vú y “Utopía” pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Tratamiento	Cultivar	Método de desinfección	Explante	Tasa de contaminación Valor medio+D.E.	C.V.
1	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rb	0±0 a	Sd
8	Deja vú	Agua caliente	Rt	0.2 ± 0.45 ab	223.61
10	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rb	0.2 ± 0 ab	223.61
17	Utopía	Agua caliente	Rt	0.4±0.45 abc	136.93
2	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rt	0.4±0 abc	136.93
7	Deja vú	Agua caliente	Rb	0.4±0.55 abc	136.93
14	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rt	0.4±0 abc	136.93
3	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Ye mas	0.6±0 abc	91.29
6	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Ye mas	0.8± 0.55 bc	55.9
12	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Ye mas	0.8±0 bc	55.9

5	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rt	1.0 ±0.55 c	0
9	Deja vú	Agua caliente	Ye mas	1±0.55 c	0
11	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹)	Rt	1±0 c	0
16	Utopía	Agua caliente	Rb	1±0 c	0
18	Utopía	Agua caliente	Ye mas	1±0.45 c	0
13	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rb	1±0.55 c	0
15	Utopía	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Ye mas	1±0.45 c	0
4	Deja vú	Kasugamicina (1.5 ml L ⁻¹)	Rb	1±0 c	0

H

31.02

D.E=Desviación estándar; C. V=Coeficiente de variación; H=Estadístico para la prueba Kruskal y Wallis. Medias con la misma letra no son estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La incidencia de contaminación por bacterias fue más persistente en comparación con la de hongos. Los explantes que no presentaron contaminación comenzaron a necrosarse y no se obtuvo desarrollo, es posible que la temperatura haya causado daños en el tejido vegetal (Figura 19).

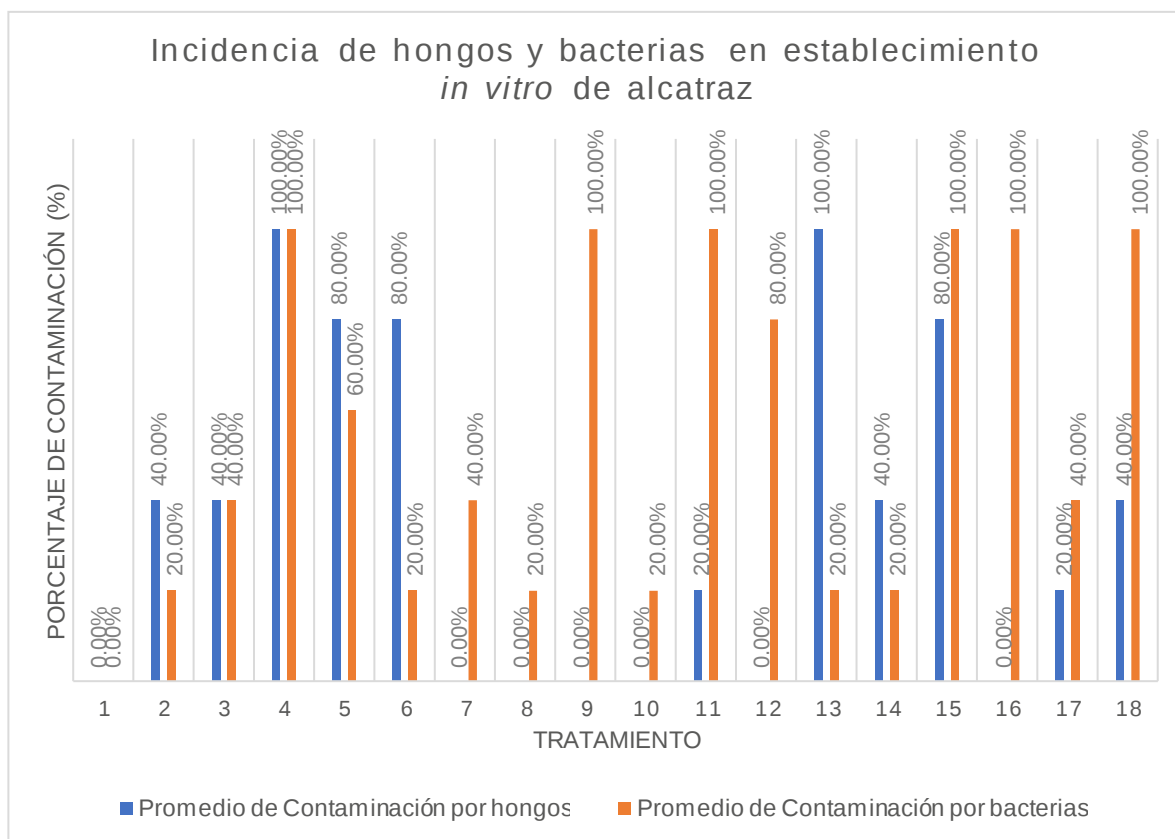


Figura 19. Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en muestras de Rb (Región basal), Rt (Región terminal) y yemas adventicias (Y) a los 11 días después del establecimiento para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de los cultivares Utopía y Deja vú.

Experimento 9

A pesar de la contaminación generada en yemas, se observó que estas lograron desarrollarse parcialmente, por lo que se optó utilizar únicamente este explante en el último bioensayo. En el cuadro 11, se muestra el efecto de los tratamientos sobre la contaminación, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos empleados ($P \leq 0.05$), el uso de agrimicyn + benomilo a 2 g L^{-1} (T7) y nitrato de plata a 80 mg L^{-1} (T8) puede mejorar considerablemente la descontaminación de las yemas de Utopía, en contraste con el método utilizado por Mori et al. (1999) en el cuál dosis de 200 mg L^{-1} hasta 2 g L^{-1} fueron útiles para descontaminar en $>80 \%$ yemas apicales de *Z. hybrida*. Los tratamientos con PPM presentaron las mayores tasas de contaminación principalmente por bacterias, esta situación refuerza la hipótesis de presencia de bacterias endófitas no

detectadas en el análisis fitosanitario. Anteriormente, Thomas, Agrawal y Bharatkumar (2017) observaron que con el uso de PPM a 5 % durante 4 horas se presentó 80 % de contaminación en brotes axilares de papaya, además de fitotoxicidad para dosis más altas, también realizaron aislamientos de muestras contaminadas e identificaron bacterias tolerantes a PPM, entre ellas bacterias grampositivas, actinobacterias y bacterias gramnegativas a las que pertenecen las asociadas a la pudrición blanda en alcatraz.

Cuadro 11. Efecto de los tratamientos sobre la tasa de contaminación en el establecimiento *in vitro* de yemas adventicias de los cultivares Deja vú y Utopía pertenecientes a *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Tratamiento	Cultivar	Método de control de patógenos	Tasa de contaminación Valor medio + D.E.	C.V.
7	Utopía	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹) + Inex A (1 ml L ⁻¹)	0 ± 0 a	sd
8	Utopía	Nitrato de plata (80 mg L ⁻¹) + Inex A (1 ml L ⁻¹)	0.2 ± 0.45 ab	223.61
9	Deja vú	Agrimicyn (2 g L ⁻¹) + Benomilo (2 g L ⁻¹) + Inex A (1 ml L ⁻¹)	0.4±0.55 abc	136.93
4	Deja vú	PPM (2.5 %)	0.6±0.55 abc	91.29
10	Deja vú	Nitrato de plata (80 mg L ⁻¹)	0.8±0.45 bc	55.9
1	Utopía	PPM (2.5 %)	0.8±0.45 bc	55.9
5	Deja vú	PPM (5 %)	0.8±0.45 bc	55.9
3	Utopía	PPM (6 %)	0.8±0.45 bc	55.9

2	Utopía	PPM (5 %)	1±0	c	0
6	Deja	PPM (6 %)	1±0	c	0
	vú				
H			16.06		

D.E=Desviación estándar; C. V=Coeficiente de variación; H=Estadístico para la prueba Kruskal y Wallis. Medias con la misma letra no son estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias por tratamiento a los 8 días después del establecimiento se muestra en la Figura 19, la incidencia de bacterias fue más alta.

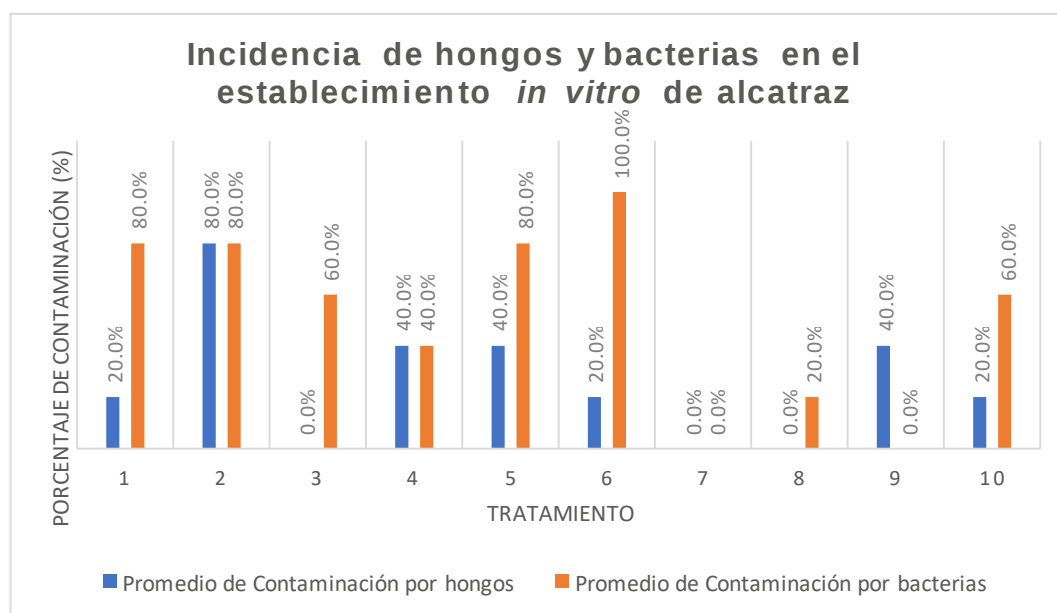


Figura 20. Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en muestras de yemas adventicias a los 8 días después del establecimiento para el control de contaminantes del cultivo *in vitro* de los cultivares Utopía y Deja vú.

En la serie de experimentos que se condujeron se observó diversas colonias de hongos (Figura 21) y bacterias (Figura 22) incluso en tejido proveniente de la región medular del rizoma

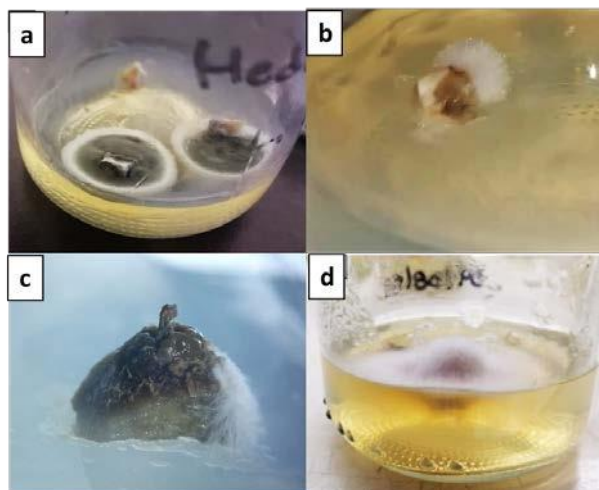


Figura 21. Presencia de hongos durante el establecimiento *in vitro* de explantes de alcatraz (*Z. aethiopica* L. Spreng). a) Colonia de hongos en tejido de la región medular basal; b-c) Desarrollo de micelo en yemas adventicias de rizoma; d) Desarrollo de micelio en región medular terminal.

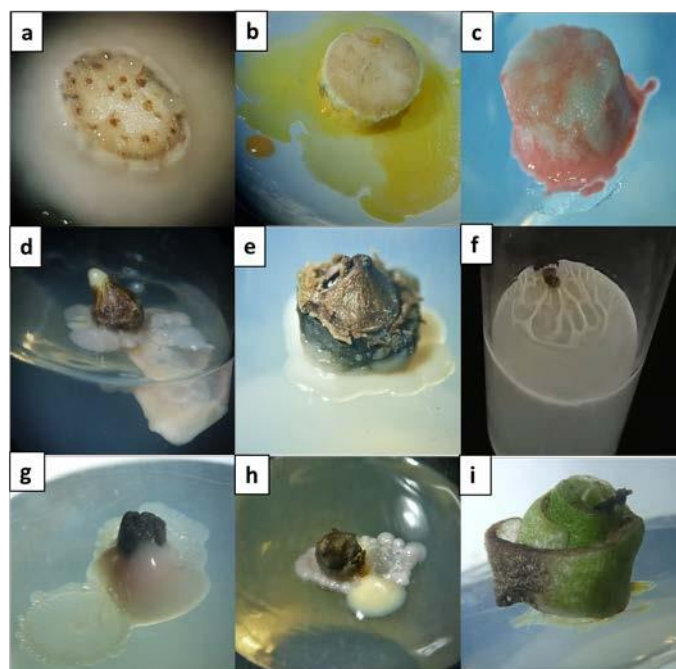


Figura 22. Presencia de bacterias durante el establecimiento *in vitro* de explantes de *Z. aethiopica* L. Spreng. a-c) Contaminación por bacterias en tejido medular de la región basal del rizoma; d-f) Contaminación por bacterias en yemas adventicias; g-i) Contaminación por bacterias en tejido de la región terminal del rizoma.

Los explantes que no se contaminaron presentaron endurecimiento y necrosis por lo que no se sometieron a la etapa de multiplicación (Figura 23).

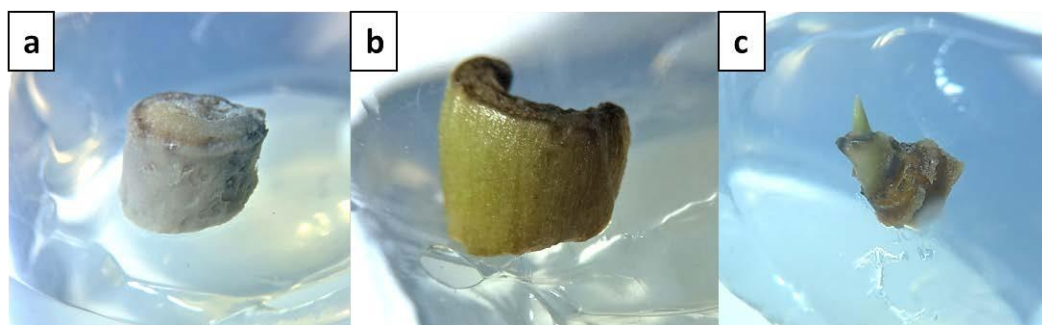


Figura 23. Daños en tejidos de *Z. aethiopica* L. Spreng. a) Endurecimiento superficial en tejido de la región basal; b) Necrosis inicial en tejido de región terminal; c) Necrosis inicial en yema.

3.5. Conclusiones

Se logró establecer dos protocolos de desinfestación con base en el uso de un bactericida y fungicida comerciales además de Nitrato de Plata para explantes provenientes de diferentes regiones de rizoma de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng en los cultivares Utopía y Deja vú, sin embargo, es necesario continuar con la evaluación de diferentes condiciones de cultivo, dosis de antibióticos y fungicidas, así como otros órganos de la planta que permitan avanzar en las siguientes etapas de cultivo. El diagnóstico fitosanitario es una herramienta que ayuda al investigador a conocer los contaminantes que posiblemente se desarrollen durante las etapas del cultivo *in vitro*, dimensionar su patogenicidad y virulencia y por lo tanto diseñar protocolos adecuados para su control. Es necesario realizar la detección e identificación de hongos, bacterias y virus antes iniciar el trabajo de laboratorio, pero también se sugiere realizarlo si se encuentran bacterias resistentes a los antibióticos durante el proceso.

Literatura citada

- Chen, C. C., Ko, W. F., Lin, C. Y., Jan, F. J., & Hsu, H. T. (2003). First report of Carnation mottle virus in Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Plant disease*, 87(12), 1539-1539. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.12.1539C>
- Chen, L. R., Lin, P. R., & Huang, C. J. (2020). First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot disease of white calla lily in Taiwan. *Plant Disease*, 104(2), 563. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1273A>
- Ciampi, L., Nissen, J., Venegas, E., Fuentes, R., Costa, M., Schöbitz, R., ... & Alvarado, P. (2009). Identification of two species of *Fusarium* link that cause wilting of colored callas (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.) cultivated under greenhouse conditions in Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 69(4), 516-525. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392009000400006>
- Cruz-Castillo, J.G. 2022. 'Utopia': A New *Zantedeschia aethiopica*. *HortScience*. 57(3):443. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16321-21>
- Cruz-Castillo, J.G.; Torres-Lima, P.A. (2017). 'Deja Vu' un nuevo cultivar de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 23(2), 97-101. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.01.005>.
- García López, F (2010) *Efecto de la cepa bacteriana CAE-01 y fumigación al suelo sobre la pudrición blanda en el cultivo de alcatraz en La Perla, Veracruz*. (tesis de maestría) Universidad Autónoma Chapingo. México.
- González, J. M., Espinosa, H. L., & Torres, I. L. (2007). La horticultura ornamental en el estado de Veracruz, México. *Actas de Horticultura Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*, 48, 485-488.
- Hashemidehkordi, E., Mortazavi, S. N., & Azadi, P. (2021). An Efficient in vitro Propagation Protocol of Pot Calla lily (*Zantedeschia* spp cv. Orania and Sunclub) via Tuber Production. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(4), 343-351. <https://dx.doi.org/10.22059/ijhst.2021.317458.436>
- Joubert, J. J., & Truter, S. J. (1972). A variety of *Xanthomonas campestris* pathogenic to *Zantedeschia aethiopica*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 78(5), 212-217 <https://doi.org/10.1007/BF01977321>
- Krejar, V., Mertelík, J., Pánková, I., Kloudová, K., & Kúdela, V. (2008). *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp.

Plant Protection Science, 44(3), 85-90. <https://doi.org/10.17221/16/2008-PPS>

- Kwon, S. B., Ha, J. H., Yoon, J. Y., & Ryu, K. H. (2002). Zantedeschia mosaic virus causing leaf mosaic symptom in calla lily is a new potyvirus. *Archives of virology*, 147(12), 2281-2289. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0899-Y>
- Lee, Y. A., Chen, K. P., & Chang, Y. C. (2002). First report of bacterial soft rot of white flowered calla lily caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. *Plant Disease*, 86(11), 1273-1273.5r3 <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1273A>
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Sulikowska, M., Puławska, J., & Treder, J. (2010). Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology*, 158(4), 201-209.
- Miyazaki, J., Tan, B. H., & Errington, S. G. (2010). Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3), 365-372. 90. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9741-5>
- Mokra, V., & Götzová, B. (1992, August). Identification of virus infections in *Dieffenbachia* and *Zantedeschia* in Czechoslovakia. En *VIII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants* 377 (pp. 361-362). 10.17660/Acta Hortic.1994.377.41
- MORI, G., KUBO, T., MIMURA, H., & YAMAGUCHI, T. (1999). Elimination of endogenous contamination in cultured tuber explants of *Zantedeschia*. *Environment Control in Biology*, 37(3), 225-228. <https://doi.org/10.2525/ecb1963.37.225>
- Nery, F. C., Prudente, D. O., Paiva, R., Nery, M. C., Paiva, P. D. O., & Domiciano, D. (2017, April). Micropropagation and histological analysis of Calla lily. *VII International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants* 1224 (pp. 183-190). [10.17660/ActaHortic.2018.1224.24](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.24)
- Paredes D. E. 2006. Composta de residuos de jardinería en la producción de calla (*Zantedeschia albomaculata* y *Zantedeschia*). Tesis profesional. Chapingo Departamento de Fitotecnia. Tesis de Licenciatura. Texcoco. México. p. 85.
- Rizzo, D., Panattoni, A., Stefani, L., Paoli, M., Nesi, B., Lazzereschi, S., Vanarelli, S., Fariña, P., Bartola, P., Della M., Materazzi, A., & Luvisi, A. (2015). First

report of Zantedeschia mild mosaic virus on Zantedeschia aethiopica in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 399.
<https://doi.org/10.4454/JPP.V97I2.019>

Thomas, P., Agrawal, M., & Bharathkumar, C. B. (2017). Use of Plant Preservative Mixture™ for establishing *in vitro* cultures from field plants: Experience with papaya reveals several PPM™ tolerant endophytic bacteria. *Plant Cell Reports*, 36(11), 1717-1730.
<https://doi.org/10.1007/s00299-017-2185-1>

Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Franczuk, M., Jońca, J., Wielgomas, B., ... & Waleron, K. (2019). *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and applied microbiology*, 42(3), 275-283.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.08.004>

Wolf, J. M., Boer, S. H. D., Czajkowski, R., Cahill, G., Gijsegem, F. V., Davey, T., ... & Waals, J. E. (2021). Management of diseases caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. In *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species* 175-214. *Springer, Cham*.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_6

Wright, P. J. (1998). A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(4), 331-334.
<https://doi.org/10.1080/01140671.1998.9514072>

4. GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* L. SPRENG)

RESUMEN

Con el objetivo de diseñar un protocolo de germinación *in vitro* de semillas de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng), se evaluó la viabilidad con tinción de cloruro de tetrazolio al 1 %, el porcentaje de emergencia y tiempo medio de germinación de semillas obtenidas de frutos inmaduros (en desarrollo) y maduros. Las semillas fueron pretratadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % y agua estéril establecidas *in vitro* en un medio con sales Murashige & Skogal 100 % adicionado con los reguladores de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) (0, 0.3, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹) en combinación con Ácido giberélico (AG₃) (3.0, 0.3, 1.0 y 0 mg L⁻¹). Este establecimiento se comparó con la siembra en condiciones de invernadero y en cámara de germinación. En invernadero la siembra se realizó a tres profundidades en un sustrato compuesto por peat moss con agrolita en una proporción 2:1 mientras que en incubadora las semillas se establecieron en cajas Petri a 33°C y 80 % de humedad relativa (HR). En los tres casos se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial. Los resultados se analizaron mediante la prueba Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y una prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$). Se determinó que la latencia de la semilla puede superarse con la imbibición de la semilla en H_2O_2 , sin embargo, con la concentración utilizada hubo un retraso en la germinación por lo que se recomienda realizar pruebas con niveles menores al 30 % en el cultivo *in vitro*. El medio suplementado con 3.0 mg L⁻¹ de AG₃ y 0.3 mg L⁻¹ de BAP presentó el menor tiempo medio de germinación (35 días después del establecimiento) por otra parte, no se observó efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de emergencia.

Palabras clave: Semillas, calla lily, viabilidad

***In vitro* GERMINATION SEEDS OF CALLA LILY (*Zantedeschia aethiopica* L. SPRENG)**

Abstract

In order to design an *in vitro* protocol for calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) seeds germination, the viability with 1 % tetrazolium chloride salts, the percentage of emergence and mean germination time of seeds obtained from immature (developing) and mature fruits were evaluated. Seeds were pretreated with 30 % hydrogen peroxide (H₂O₂) and sterile water and established *in vitro* on a 100 % Murashige & Skog salts medium with the growth regulators benzylaminopurine (BAP) (0, 0.3, 1.0 and 3.0 mg L⁻¹) in combination with gibberellic acid (GA₃) (3.0, 0.3, 1.0 and 0 mg L⁻¹). This establishment was compared with sowing under greenhouse and germination chamber conditions. In the greenhouse, sowing was carried out at three depths in a substrate composed of peat moss with agrolite in a 2:1 ratio, while in the incubator the seeds were established in Petri boxes at 33°C and 80 % relative humidity (RH). In all three cases, a completely randomized experimental design with factorial arrangement was established. The results were analyzed using the Kruskal and Wallis test for nonparametric analysis of variance and a Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$). It was determined that seed dormancy can be overcome with seed imbibition in H₂O₂, however, with the concentration used there was a delay in germination so it is recommended to test with levels lower than 30 % for *in vitro* culture. The medium supplemented with 3.0 mg L⁻¹ of GA₃ and 0.3 mg L⁻¹ of BAP presented the shortest mean germination time (35 days after establishment), on the other hand, no effect of the treatments on the percentage of emergence was observed.

Key words: *Seeds, calla lily, viability*

4.1. Introducción

El alcatraz (*Zantedeschia spp.*), es una planta apreciada por su uso ornamental, es originaria de África y forma parte de la familia *Araceae* (Nery et al., 2015), desafortunadamente su producción se ha visto mermada por patógenos asociados a la pudrición blanda, la cual ocasionó pérdidas a nivel mundial de hasta del 100 % en el campo durante la década de 1980 (Vanneste, 1996 en Mikiciński et al., 2010). El género *Zantedeschia* está dividido en dos secciones; sección *Zantedeschia* y sección *Aestivae*, la primera comprende las especies *Z. aethiopica* y *Z. odorata*, la sección *Aestivae* engloba a *Z. albomaculata*, *Z. rehamannii*, *Z. elliottiana*, *Z. jucunda*, *Z. valida* y *Z. petlandii* (Wei et al., 2017). La mayoría de los cultivares se propagan vegetativamente, aunque algunos son híbridos F1, por lo que se obtienen mediante semillas (Snijder, Brown & van Tuyl, 2007) las cuáles son coriáceas, subglobosas u ovoides, a menudo comprimidas (Letty, 1973), con abundante endospermo y embrión en posición lineal (El Mokni & El Aouni, 2012).

A pesar de que México consume el 80 % de la producción nacional de plantas ornamentales (SIAP, 2011), se registró un aumento de la importación de bulbos, tubérculos, raíces tuberosas, bulbillos, coronas y rizomas provenientes de Nueva Zelanda (Statistics New Zealand, 2021) por lo que la propagación mexicana de ornamentales geófitos no satisface la demanda interna. Además del alcatraz criollo y otros cultivares de colores, en nuestro país únicamente se tiene ante el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) los cultivares Deja vú (Cruz-Castillo & Torres Lima, 2017) y Utopía (Cruz Castillo, 2022), el primero fue obtenido mediante el cruce de plantas de 'Green Goddess' (padre) x 'Pink Mist', el producto de esta cruce se polinizó con 'Green Goddess', el individuo resultante se autofertilizó y se designó como 'Deja vú' (Cruz-Castillo & Torres Lima, 2017) mientras que 'Utopía' es una planta originada del cruce de 'Deja vú' (padre) x 'Pink Mist' (Madre) (Cruz Castillo, 2022).

La elección de semillas como explante en el cultivo de tejidos ofrece la oportunidad de seleccionar una característica particular, por ejemplo, floración

temprana, tolerancia a la salinidad, ciertas temperaturas o para el desarrollo de clones mejorados (Ngamau, 2006) además de obtener plantas libres de enfermedades, por lo que resulta importante diseñar un protocolo de micropropagación *in vitro* a partir de semillas de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng.

Las semillas de alcatraz germinadas sobre papel filtro con un fotoperiodo de 12 horas pueden presentar los mayores porcentajes de emergencia en un periodo de 40 días a temperaturas bajas (5-15 °C) (Panetta, 1988). En invernadero, la germinación se ve afectada por el tipo de sustrato, se ha demostrado que los sustratos ricos en materia orgánica son adecuados (Juárez-Hernández, Martínez-Solís, Curiel-Rodríguez & García-Santos, 2011)

Como antecedentes en el cultivo *in vitro* de semillas de *Zantedeschia*, se determinó que influyen factores como el medio de cultivo, el estado de madurez de la semilla, temperatura, la concentración de agar, sacarosa. La germinación se puede dar a 20 °C, pero las tasas de germinación más altas se pueden presentar a 14 °C (Ngamau, 2001). Se sabe que reguladores del crecimiento como las giberelinas estimulan la germinación de las semillas (Nery et al., 2015).

Son determinantes en el proceso de evaluación de la calidad de las semillas las pruebas estándar de viabilidad y germinación en sustrato y en cámara de germinación, por lo que este trabajo de investigación estuvo conducido para observar el efecto de dos esquemas de desinfestación-escarificación, dos estados de madurez de la semilla, cuatro concentraciones de AG₃: BAP y su comparación con la germinación en incubadora e invernadero.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material vegetal

La semilla perteneciente al alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) fue proporcionada por el Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo, profesor investigador del Centro Regional Universitario (CRUO) de la Universidad Autónoma Chapingo. Se recibieron los frutos en dos estados de madurez; inmaduro y completamente maduro para las pruebas correspondientes (Figura 24

y 25).



Figura 24. Infrutescencia de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) en dos estados de maduración: a) Infrutescencia en desarrollo; b) Infrutescencia madura y con frutos completamente expandidos.



Figura 25. Semillas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) provenientes de frutos en dos estados de maduración: a) Semilla de fruto inmaduro; b) Semilla de fruto maduro.

4.2.2. Ubicación del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Semillas, el Invernadero y Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Autónoma Chapingo. En el Laboratorio de semillas se realizaron las pruebas de viabilidad con cloruro de tetrazolio (CTT) y establecimiento en la cámara de germinación, en el Invernadero de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia también se llevó a cabo una prueba de germinación en sustrato y el experimento de germinación *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

4.2.3. Imbibición de la semilla

Las semillas se aislaron de los frutos, la mitad de las semillas de cada madurez se sometió a dos formas de imbibición; agua estéril y peróxido de hidrógeno al 30 % el cual también fungió como desinfectante del tejido vegetal en el establecimiento aséptico. La oxidación de los inhibidores de germinación presentes en el pericarpio por H_2O_2 promueve la germinación de semillas en *Zinnia elegans* (Ogawa & Iwabuchi, 2001) por lo que se esperó que la imbibición en peróxido de hidrógeno al 30 % afectara la emergencia de la semilla.

4.2.4. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio

Las sales de tetrazolio se usan para mostrar la actividad del grupo de enzimas deshidrogenasas, estas enzimas reducen la solución de tetrazolio a un compuesto denominado formazan que adquiere el característico color rojizo en tejido vivo (Bulat, 1961, citado por MacKay, 1972).

Se seleccionaron 10 unidades de cuatro lotes de semillas; de frutos maduros tratados con peróxido de hidrógeno y agua estéril así como de frutos inmaduros tratados con peróxido y agua estéril. Con base en las observaciones de Panetta (1988) y El Mokni & El Aouni (2012) acerca de las características anatómicas de la semilla y la posición del embrión se realizó un corte longitudinal para exponer el embrión. Las dos partes de las semillas se colocaron en cajas Petri y se añadió la solución de cloruro de tetrazolio al 1 %, las 4 muestras se colocaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 horas.

4.2.5. Establecimiento en cámara de germinación

Panetta (19988) observó que la eliminación del pericarpio provocó la muerte de la mayoría de las semillas por lo que, en los establecimientos en invernadero, germinadora y cultivo *in vitro* esta capa no fue removida.

Para establecer este experimento se seleccionaron 10 semillas al azar de cada lote de semillas de frutos maduros tratados con peróxido de hidrógeno y agua estéril así como de frutos inmaduros tratados con peróxido y agua estéril.

Se colocaron 10 semillas sobre hojas de papel en cajas petri de vidrio de 60 x 15 mm previamente esterilizados en autoclave a 120 °C y a una presión de 15 kg cm², el abastecimiento de agua se realizó con agua desionizada y estéril. Las semillas se incubaron a 33°C y 80% de humedad relativa en oscuridad durante 60 días.

4.2.6. Germinación *in vitro* de semillas de *Zantedeschia aethiopica* L.

Spreng

4.2.6.1. Establecimiento aséptico

Las semillas se desinfestaron mediante dos métodos (Figura 26)

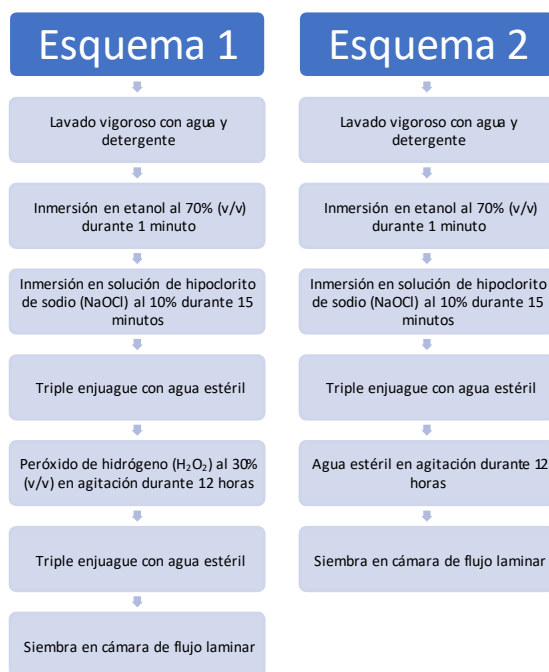


Figura 26. Esquemas de desinfestación de semilla de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) previo al establecimiento *in vitro*.

Las semillas se establecieron en un medio con las sales orgánicas MS al 100% adicionado con 100 mg L⁻¹ de inositol, 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 3% de sacarosa, 60 mg L⁻¹ de L-cisteína, 100 mg L⁻¹ de ácido glutámico y 5.2 g L⁻¹ de Phytigel®, con el pH ajustado a 5.7. Para su elaboración, el medio preparado se repartió en cuatro matraces Erlermeyer de 500 ml y con una pipeta de 5 ml se añadió en cada uno la concentración de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) como fuente de citocinina de acuerdo con el cuadro 12, los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C y una presión de 15 kg cm⁻² durante 20 minutos, de igual manera se esterilizaron 80 frascos Gerber para servir el medio dentro de la cámara de flujo laminar. Una vez transcurrido el tiempo de esterilización y descompresurización del equipo el medio se llevó a la cámara de flujo laminar para añadir a cada matraz la concentración de ácido giberélico (AG₃), este paso se realizó con la ayuda de una jeringa conectada a un filtro milipore de 20 micras debido a que el AG₃ es un compuesto termolábil que al pasar por esterilización en autoclave existe el riesgo de que se inactive. Se sirvió 30 ml de cada medio en frascos Gerber los cuales se taparon y se sellaron para dejarse enfriar.

Cuadro 12. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido giberélico (AG₃) empleados en la germinación *in vitro* de semillas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)

Medio	BAP (mg L ⁻¹)	AG ₃ (mg L ⁻¹)
M1	0	0
M2	0.3	3.0
M3	1.0	1.0
M4	3.0	0.3

4.2.6.2. Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tres factores con dos niveles para el factor “estado de madurez de la semilla”, dos niveles para “escarificación” y cuatro niveles para “medio de cultivo”,

es decir, $2 \times 2 \times 4 = 16$ tratamientos con tres repeticiones dando como resultado 48 unidades experimentales (Cuadro 13) Cada unidad experimental consistió en un frasco con cinco semillas. En total se establecieron 240 semillas las cuáles permanecieron en sala de incubación a 24°C con un fotoperiodo de 16 horas de iluminación con un flujo de fotones de $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación *in vitro*, porcentaje de emergencia y tiempo medio de germinación (TMG) expresado en días después del establecimiento (DDE). Los tratamientos que no presentaron germinación se descartaron para el análisis estadístico Los datos se analizaron con el paquete estadístico Infostat versión 2015, se realizó una prueba de Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y una prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). También se obtuvo la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.)

Cuadro 13. Tratamientos utilizados en la germinación *in vitro* de semillas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Tratamiento	Maduración del fruto	Método de escarificación	Medio de cultivo
T1	Madurez completa	Peróxido de hidrógeno	M1
T2	Madurez completa	Peróxido de hidrógeno	M2
T3	Madurez completa	Peróxido de hidrógeno	M3
T4	Madurez completa	Peróxido de hidrógeno	M4
T5	Madurez completa	Agua estéril	M1
T6	Madurez completa	Agua estéril	M2
T7	Madurez completa	Agua estéril	M3

T8	Madurez completa	Agua estéril	M4
T9	Inmadura	Peróxido de hidrógeno	M1
T10	Inmadura	Peróxido de hidrógeno	M2
T11	Inmadura	Peróxido de hidrógeno	M3
T12	Inmadura	Peróxido de hidrógeno	M4
T13	Inmadura	Agua estéril	M1
T14	Inmadura	Agua estéril	M2
T15	Inmadura	Agua estéril	M3
T16	Inmadura	Agua estéril	M4

4.2.7. Establecimiento de ensayo de germinación en invernadero

En el establecimiento en invernadero, se evaluó la emergencia en las semillas maduras e inmaduras, así como la profundidad de siembra. La semilla se estableció en un sustrato compuesto por peat moss y agrolita en una proporción 2:1, cada unidad experimental consistió en una charola de 10*10*5 cm con cinco semillas cada una con tres profundidades de siembra; superficial (0.5 cm), intermedia (1 cm), profunda (1.5 cm) (Cuadro 14). La siembra se realizó a inicios del invierno de acuerdo con lo recomendado por Panetta (1988).

Cuadro 14. Tratamientos utilizados en la germinación de semillas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) en sustrato con peat moss y agrolita (1:1)

Tratamiento	Estado de madurez de semilla	Profundidad de siembra
T1	Madura	Superficial
T2	Madura	Intermedia
T3	Madura	Profunda
T4	Inmadura	Superficial
T5	Inmadura	Intermedia
T6	Inmadura	Profunda

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio

Se observó que el embrión fue la estructura donde se presentó la coloración generada por el reactivo del tetrazolio (Figura 27). La tinción con tetrazolio al 1% en semillas de fruto maduro tratadas con peróxido (Figura 28a) reveló la actividad metabólica ya que se presentó el 100% de tinción en comparación con las semillas de frutos inmaduros embebidas únicamente con agua (Cuadro 15). Normalmente, la ausencia de tinción en una prueba con tetrazolio indica que no existe actividad metabólica en el tejido, es decir, muerte del embrión (Mackay, 1972), no obstante, Busso ,Torres , Ithurrart y Richards (2015) demostraron que el cloruro de tetrazolio puede no indicar correctamente la actividad fisiológica de la semilla de especies como la papaya (*Carica papaya*) esto se determinó mediante la aplicación de azul de Evans a semillas que no se tiñeron con el cloruro de tetrazolio, sus resultados demostraron que entre el 2 y 35% de los embriones no estaban muertos sino latentes, dicho de otra manera, viables y con la capacidad de desarrollarse. Con lo anterior, podemos suponer que las semillas de frutos inmaduros embebidas con agua estéril presentaban latencia.

Para las semillas de frutos inmaduros tratadas con agua estéril presentaron 30% de viabilidad del embrión (Figura 28b) y con peróxido de hidrógeno únicamente 10% (Cuadro 15) estos resultados difieren de los obtenidos por Panetta (1988) cuya prueba con cloruro de tetrazolio al 1% reveló 100% de viabilidad en semillas provenientes de frutos de alcatraz criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) completamente expandidos pero verdes aún

Cuadro 15. Porcentajes de viabilidad para cuatro grupos de semilla de alcatraz blanco (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) tratados con cloruro de tetrazolio al 1%.

Madurez del fruto	Tratamiento de escarificación	Porcentaje de tinción (%)
Madurez	Agua estéril	0
Madurez	Peróxido de hidrógeno	100
Inmaduro	Agua estéril	30
Inmaduro	Peróxido de hidrógeno	10

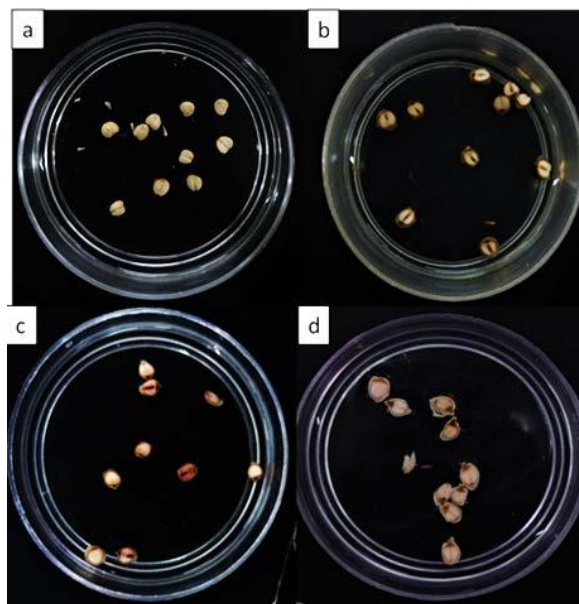


Figura 27. Semillas de alcatraz blanco o criollo (*Z.aethiopica* L. Spreng) sometidas a la prueba de cloruro de tetrazolio al 1%. a) Semillas de frutos maduros tratadas con agua estéril; b) Semillas de frutos maduros tratadas con H₂O₂ al 30%; c) Semillas de frutos inmaduros tratadas con agua estéril y d) semillas de frutos inmaduros tratadas con H₂O₂ al 30%.

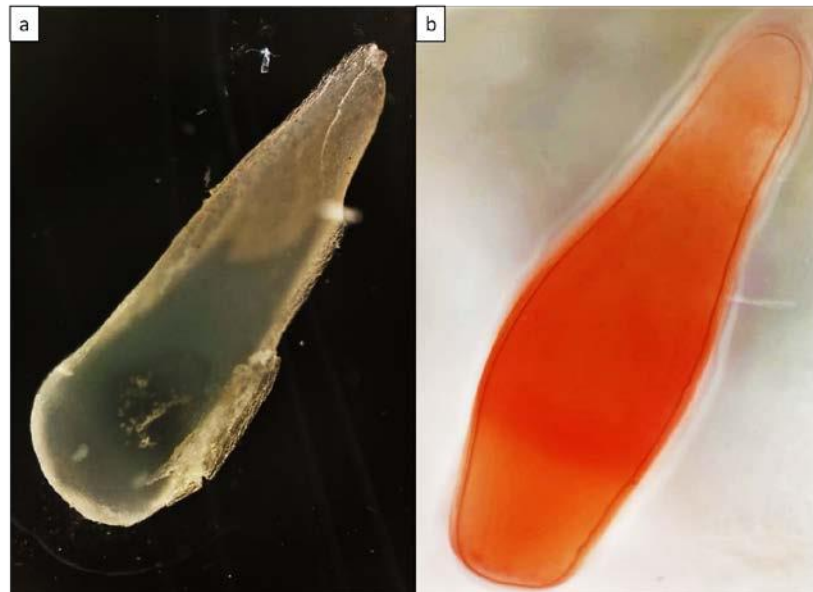


Figura 28. Embriones de alcatraz blanco o criollo vistos con una lente portátil 400x (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) tratados con cloruro de tetrazolio al 1%. a) Embrión proveniente de semilla de fruto maduro tratada con H₂O₂ al 30%; b) Embrión proveniente de semilla de fruto inmaduro tratado con agua estéril.

4.3.2. Germinación *in vitro* de semillas

A pesar de haber obtenido el 100% de viabilidad de la semilla madura escarificada con peróxido únicamente se observó emergencia en los tratamientos con semillas provenientes de frutos inmaduros embebidos en agua estéril. El peróxido forma parte de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que juega un papel importante en la germinación, cuando el contenido de ERO es demasiado alto, por causas de envejecimiento o condiciones inapropiadas durante la imbibición las ERO causan daños oxidativos en las células que impiden o retrasan la germinación (Bailly, El-Maarouf-Bouteau & Corbineau, 2008).

Con la prueba de Kruskal y Wallis en los tratamientos que tuvieron germinación, se determinó que no existieron diferencias significativas para la variable de porcentaje de emergencia ($p \leq 0.05$), sin embargo, se observó diferencias significativas para la variable tiempo medio de germinación (TMG) ($p \leq 0.05$) (Cuadro 16). La presencia de AG₃ promovió la emergencia, con el tratamiento 14

que consistió en un medio MS al 100% adicionado únicamente con 3.0 mg L⁻¹ AG3 se obtuvo el TMG más corto de 35 DDE, similar a los 29 y 36 días registrados por Ngamau (2001) para variedades de floración temprana y variedades de floración tardía (*Zantedeschia aethiopica* “Green Goddess”) respectivamente e incubados a 23 °C, en el presente estudio, con el uso de un medio sin la presencia de reguladores de crecimiento se prolongó el TMG a los 56 DDE (T13).

En cuanto al porcentaje de emergencia, Nery et al. (2015) obtuvieron una tasa del 33% en medio WPM para semillas de frutos inmaduros y 24% para frutos maduros en medio MS y al adicionar 0.8 o 0.2 mg L⁻¹ de AG₃ utilizando semillas inmaduras se generó el 20% de germinación y 10% con semillas maduras.

Cuadro 16. Efecto de los reguladores del crecimiento en la emergencia y tiempo medio de germinación de semillas provenientes de frutos inmaduros de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Sprengo) tratadas con agua estéril

Tratamiento	Emergencia (%)	C.V.	TMG (DDE)	C.V.
	Valor medio+D.E.	(%)	Valor medio+D.E.	(%)
14	20+34.64	173.21	35 + 1 a	2.86
16	20+34.64	173.21	44+ 5.29 ab	12.03
15	40+34.64	86.60	47.67+ 6.95 b	14.58
13	33.3+57.74	173.21	56+3.74 b	6.68
H			0.53	

C.V.=Coeficiente de variación; TMG=Tiempo medio de germinación; DDE=Días después del establecimiento; H=Estadístico de prueba Kruskal y Wallis. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$).

La figura 29 ilustra la emergencia y desarrollo de plántulas obtenidas a partir de semilla proveniente de frutos inmaduros establecidas en los cuatro medios de cultivo, de igual forma, en la figura 30 se aprecia la secuencia de emergencia y desarrollo de la primera hoja de una plántula de alcatraz.

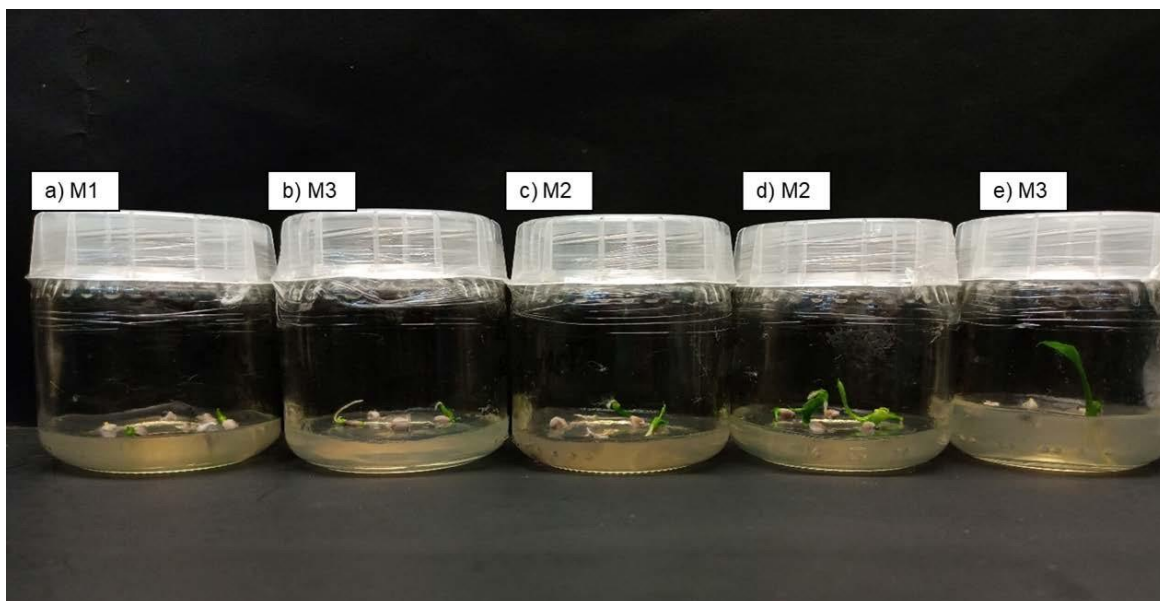


Figura 29. Emergencia de plántulas de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) a los 66 DDE; a-c) Desarrollo de la radícula y emergencia de la plúmula d) Elongación de la plúmula; e) Primera hoja.

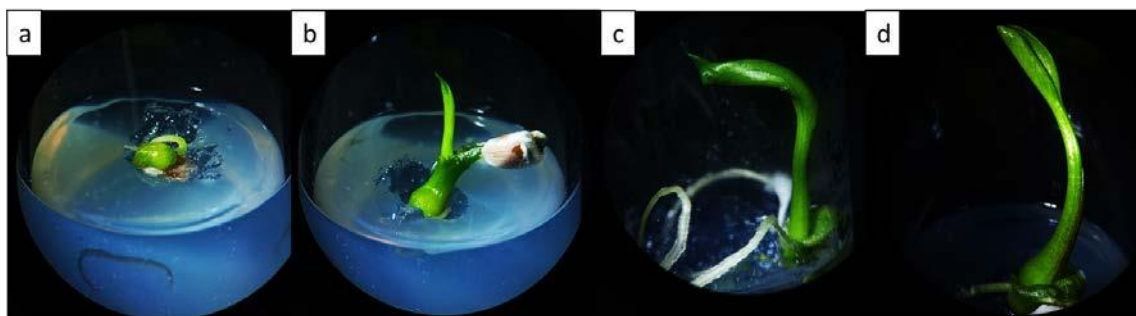


Figura 30. Secuencia de desarrollo de una plántula de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) obtenida a partir de semilla.

4.4. Conclusiones

El peróxido de hidrógeno en semillas provenientes de frutos maduros activó el metabolismo de las semillas, pero no se observó germinación *in vitro*, es posible que la concentración utilizada retrasara la germinación por lo que se sugiere evaluar niveles más bajos para superar la latencia. El presente estudio amplió la perspectiva sobre el uso de reguladores de crecimiento como AG₃ en la emergencia y tiempo medio de germinación de semillas de alcatraz o criollo (*Z. aethiopica* L. Spreng). La presencia de AG₃ (3 mg L⁻¹) acortó el tiempo medio de

germinación mientras que en el porcentaje de emergencia *in vitro* no se vió afectado por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. Se obtuvieron plántulas de alcatraz blanco (*Z. aethiopica* L. Spreng) sin presencia de patógenos en la etapa de establecimiento.

4.5. Literatura citada

- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes rendus biologies*, 331(10), 806-814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
- Busso, C., Torres, Y., Ithurrart, L., & Richards, J. H. (2015). The TTC-technique might not appropriately test the physiological stage of plant tissues. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(4), 551-556. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040068>
- Cruz-Castillo, J. G. (2022). 'Utopia': A New *Zantedeschia aethiopica* Cultivar. *HortScience*, 57(3), 443-443. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16321-21>
- Cruz-Castillo, J. G., & Torres-Lima, P. A. (2017). 'Deja Vu' a new calla lily (*Zantedeschia aethiopica*) cultivar. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(2), 97-101. doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.01.005>.
- de Jesús Juárez-Hernández, M., Martínez-Solís, J., Curiel-Rodríguez, A., & Gracia-Santos, A. (2011). PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS DE ALCATRAZ AMARILLO (*Zantedeschia elliptica* Engl.) EN DIFERENTES SUSTRATOS. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(3), 495-507. <http://ref.scielo.org/8j4wt5>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- El Mokni, R., & El Aouni, M. H. (2012). *Zantedeschia aethiopica* (Araceae) a new species naturalized in the Northwest of Tunisia. *Flora Mediterranea*, 22, 191-196. 10.7320/FIMedit22.191
- Letty, C. (1973). The genus *Zantedeschia*. *Bothalia*, 11(1/2), 5-26. <https://doi.org/10.4102/abc.v11i1/2.1963>
- MacKay, D.B. (1972). *The Measurement of Viability*. En: Roberts, E.H. (eds) *Viability of Seeds*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5685-8_7
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Sulikowska, M., Puławska, J., & Treder, J. (2010). Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology*, 158(4), 201-209. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01597.x>

- Nery, F. C., Goulart, V. L. A., Viol, M. A., Paiva, P. D. O., Paiva, R., Prudente, D. O., & Nery, M. C. (2015). In vitro germination and chemical composition of *Zantedeschia aethiopica* callus. *Acta Horticulturae*, (1083), 189–196. doi:10.17660/actahortic.2015.1083.22
- Ngamau, K. (2001). Development of an in vitro culture procedure using seeds from *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess' as explants. *Gartenbauwissenschaft*, 66(3), 133-139. https://www.pubhort.org/ejhs/2001/file_2937.pdf
- Ngamau, K. (2006, August). Selection for early flowering, temperature and salt tolerance of *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess'. En *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Ornamentals, Now!* 766 (pp. 155-162). 10.17660/Acta Hortic.2008.766.19
- Ogawa, K. I., & Iwabuchi, M. (2001). A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant and cell physiology*, 42(3), 286-291. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce032>
- Panetta, F. D. (1988). Studies on the seed biology of arum lily (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng). *Seeds*, 3, 4. <https://caws.org.nz/PPQ34/PPQ%2003-4%20pp169-171%20Panetta.pdf>
- Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) www.siap.gob.ve. Consultado en mayo, 2020.
- Snijder, R. C., Brown, F. S., & van Tuyl, J. M. (2007). The role of plastome-genome incompatibility and biparental plastid inheritance in interspecific hybridization in the genus *Zantedeschia* (Araceae). *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(2), 150-157. <https://library.wur.nl/WebQuery/wur>
- Statistics New Zealand http://infoshare.stats.govt.nz/infoshare/default.aspx?RedirectReason=session_expired Consultado en enero de 2021.
- Wei, Z., Zhang, H., Wang, Y., Li, Y., Minxiong, Xian, W. & Zhou, D. (2017). Assessing genetic diversity and population differentiation of colored Calla Lily (*Zantedeschia* Hybrid) for an efficient breeding program. *Genes* 8(6), 168. <https://doi.org/10.3390/genes8060168>

5. RESCATE Y CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng)

RESUMEN

Se realizó el rescate de embriones de semillas alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) cultivadas *in vitro* y previamente tratadas con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% y agua estéril. Los embriones aislados se sembraron en un medio con sales MS (100%) adicionado con bencilaminopurina (BAP) (0, 0.3 y 3 mg L⁻¹) y ácido giberélico (AG₃) (0, 0.3 y 3.0 mg L⁻¹). Las muestras se distribuyeron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial y se incubaron a 24°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, bajo un flujo de fotones de 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se realizó un análisis de la varianza no paramétrica con la prueba de Kruskal y Wallis ($P\leq 0.05$), los resultados mostraron que la germinación de embriones de alcatraz no se ve afectada por los factores estudiados ($P\leq 0.05$). Los tratamientos en los que se observó desarrollo de embriones fueron los que provenían de frutos inmaduros y embebidos en agua estéril, así como los provenientes de frutos maduros tratados con peróxido de hidrógeno al 1%.

Palabras clave: Rescate de embriones, calla lily, semillas.

RESCUE AND CULTURE OF CALLA LILY (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) EMBRYOS

ABSTRACT

Embryo rescue were carried on for calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) seeds grown *in vitro* and previously treated with 30% hydrogen peroxide (H₂O₂) and sterile water. Isolated embryos were seeded in a medium with MS salts (100%) added with benzyl aminopurine (BAP) (0, 0.3 and 3 mg L⁻¹) and gibberellic acid (AG3 (0, 0.3 and 3.0 mg L⁻¹). Samples were distributed in a completely randomized design with factorial arrangement and incubated at 24°C with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark, under a photon flux of 3000 µmol·m⁻² s⁻¹. A non-parametric analysis of variance was performed with the Kruskal and Wallis test ($P \leq 0.05$), the results showed that calla lily embryo germination is not affected by the factors studied ($P \leq 0.05$). The treatments in which embryo development was observed were those coming from immature fruits and soaked in sterile water, as well as those coming from mature fruits treated with 1% hydrogen peroxide.

Key words: Embryo rescue, calla lily, seeds.

5.1 Introducción

El género *Zantedeschia* se divide en dos secciones o grupos botánicos; la sección *Zantedeschia* y la sección *Aestivae*, la primera comprende las especies *Z. aethiopica* y *Z. odorata*, la sección *Aestivae* engloba a *Z. albomaculata*, *Z. rehamannii*, *Z. elliotiana*, *Z. jucunda*, *Z. valida* y *Z. petlandii* (Wei et al., 2017), aunque *Z. odorata* se encuentra entre las dos secciones, se encuentra más estrechamente asociada a *Z. aethiopica* de acuerdo con la simetría de sucariotipo (Yao, Rowland & Cohen, 1994), las plantas de *Z. aethiopica* son plantas diploides ($2n=32$) al igual que la sección *Aestivae* (Ghimire, Yu, Kim & Chung, 2012) pero es posible obtener plantas triploides a partir del cruce de plantas tetraploides (obtenidas mediante tratamiento con colchicina) con plantas diploides de especies de la sección *Aestivae* y de la aplicación del rescate de embriones, en este caso, se observó que los embriones sólo llegaron a la etapa globular y las plantas que se desarrollaron hasta la etapa de floración no produjeron polen (Yao & Cohen, 1996).

Se ha demostrado, que la sección *Aestivae* es más susceptible a la pudrición blanda causada por bacterias necrotróficas del género *Pectobacterium* (Guttman et al., 2021) por lo que es de gran interés la hibridación entre estos dos grupos para la obtención de cultivares mejorados resistentes a patógenos, sin embargo, existe una incompatibilidad interespecífica entre las dos secciones (Chi, 1990). Para superar las barreras post fertilización se ha recurrido al rescate de embriones, el cual hace referencia a una serie de técnicas aplicadas para promover el desarrollo de un embrión y así obtener una planta viable (Trigiano & Gray, 2004) y representa una oportunidad no solo para permitir el desarrollo de híbridos de cruces incompatibles sino también para obtener plantas a partir de embriones naturalmente débiles o individuos haploides, acortar el ciclo de producción (Sharma, Kaur & Kumar, 1996) así como su aplicación en estudios de fisiología y bioquímica vegetal (Shen, Gmitter & Grosser, 2010).

En la hibridación interespecífica de las dos secciones la polinización manual puede darse fácilmente, sin embargo, el desarrollo de los embriones rescatados se restringe a la etapa globular debido a la falta de transporte de nutrientes, fallas en el metabolismo y degeneración del endospermo, la mayoría de los embriones que se han logrado desarrollar presentaron albinismo (Chi, 1990) debido a la incompatibilidad plastoma-genoma (Cohen & Rowland, 1995) por otra parte, los embriones producto de la hibridación entre *Z. aethiopica* x *Z. odorata* sí produjeron plantas virescentes e incluso variegados, además de plantas albinas (Kubu, Inaba & Mori, 2006) .

Hasta el momento se ha abordado la importancia del cultivo de embriones en el fitomejoramiento para superar las barreras posteriores a la fertilización, sin embargo, no se tiene registro acerca del cultivo de embriones únicamente para acortar el tiempo de germinación o superar la latencia de la semilla de alcatraz ya que a pesar de que las plantas de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng producen una gran cantidad de semillas, estas carecen de longevidad (Panetta, 1988) y presentan porcentajes de germinación *in vitro* menores del 35% (Ngmau, 2001). La obtención de plantas de alcatraz a partir de semillas tiene una gran importancia en el fitomejoramiento y en la generación de clones libres de enfermedades, ya que, aunque el rizoma es el principal órgano de propagación por su capacidad regenerativa, la contaminación por bacterias ha dificultado su propagación *in vitro* por lo que es crucial explorar diferentes vías de obtención de plántulas a partir de otros órganos como fuente de explantes.

5.2 Materiales y métodos

En el capítulo tres referente a la germinación *in vitro* de semillas de alcatraz blanca o criolla, se observó que únicamente las semillas de frutos inmaduros pretratadas con agua estéril presentaron emergencia (Figura) y aunque la prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio (CTT) al 1% mostró una reactivación el metabolismo de los embriones extraídos de frutos maduros con la imbibición en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (v/v), estos no lograron emerger durante el establecimiento *in vitro*, por lo que se planteó realizar el rescate de los embriones

a los 76 días después del establecimiento (DDE). Se espera que los embriones de las semillas embebidas con peróxido se desarrollen. También se realizó el rescate de embriones para las semillas de frutos inmaduros que no germinaron.

5.2.1 Medio de cultivo

Se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) al 100% suplementado con 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 0.40 mg L⁻¹ de tiamina, 50 mg L⁻¹ de L-cisteína, 100 mg L⁻¹ de ácido glutámico, 5.2 g L⁻¹ de phytigel®, 40 g L⁻¹ de glucosa. Se utilizó el mismo método de elaboración usado para la germinación *in vitro* de semillas, el medio preparado se repartió en cuatro matraces Enlarmeyer de 500 ml y con una pipeta de 5 ml se añadió en cada uno la concentración de 6-bencilaminopurina (6-BAP) de acuerdo con la tabla, los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C y una presión de 15 kg cm⁻² durante 20 minutos, de igual manera se esterilizaron 48 tubos de ensayo para servir el medio dentro de la cámara de flujo laminar donde se añadió a cada matraz la concentración de ácido giberélico (AG₃) correspondiente, este paso se realizó con la ayuda de una jeringa conectada a un filtro milipore de 20

Cuadro 17. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido giberélico (AG₃) empleados en el desarrollo *in vitro* de embriones de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Medio	BAP (mg L ⁻¹)	AG ₃ (mg L ⁻¹)
M1	0	0
M2	0.3	3.0
M3	1.0	1.0
M4	3.0	0.3

Se extrajo una muestra de 12 semillas al azar de cada una de las cuatro poblaciones establecidas: semillas de alcatraz provenientes de frutos maduros pretratadas con H₂O₂ (30%), semillas de alcatraz de frutos maduros pretratadas con agua estéril, semillas de alcatraz provenientes de frutos inmaduros

pretratadas con H_2O_2 (30%) y por último semillas de alcatraz de frutos inmaduros pretratadas con agua estéril,

El proceso de localización, aislamiento y cultivo de embriones (Figura 1) se realizó bajo el estereomicroscopio dentro de la cámara de flujo laminar, primero se realizó un corte longitudinal con un bisturí desde el hilo hasta el hipocótilo de la semilla (Figura 1a-1c) Se retiró el endospermo (Figura 1d) y con la punta de una aguja hipodérmica se aisló el embrión verde (Figura 1e-1f) y se sembró en un tubo de ensayo. Las muestras se incubaron a una temperatura ambiente de 24°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y un flujo de fotones de $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

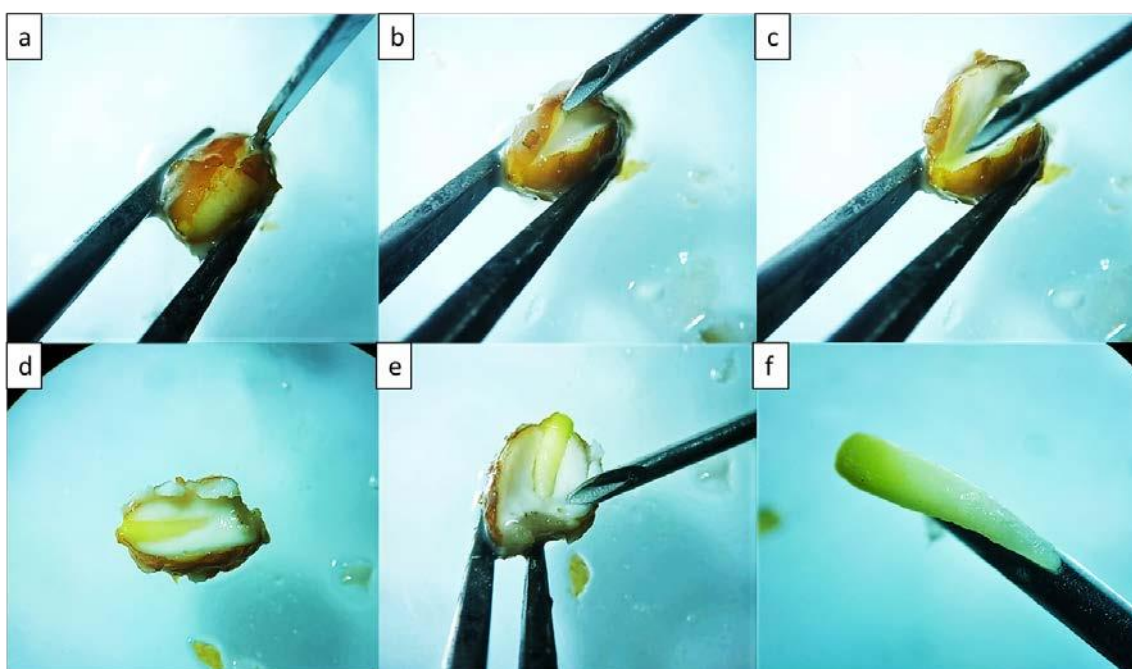


Figura 31. Secuencia de localización, aislamiento y cultivo *in vitro* de embriones de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) proveniente de semilla de fruto maduro tratada con peróxido de hidrógeno al 30%: a-c) escisión de la semilla; d-e) exposición del embrión; e) extracción del embrión.

5.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tres factores, en total se establecieron 16 tratamientos con tres repeticiones, es

decir, 48 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un embrión. Se cuantificó el número de embriones desarrollados por tratamiento. Los resultados se analizaron mediante una prueba de Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica con el paquete estadístico Infostat® versión 2015, también se determinó la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.).

Cuadro 18. Tratamientos utilizados en el desarrollo *in vitro* de embriones de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Tratamiento	Madurez del fruto	Escarificación de la semilla	Medio de cultivo
T1	Maduro	Peróxido de hidrógeno	M1
T2	Maduro	Peróxido de hidrógeno	M2
T3	Maduro	Peróxido de hidrógeno	M3
T4	Maduro	Peróxido de hidrógeno	M4
T5	Maduro	Agua estéril	M1
T6	Maduro	Agua estéril	M2
T7	Maduro	Agua estéril	M3
T8	Maduro	Agua estéril	M4
T9	Inmaduro	Peróxido de hidrógeno	M1
T10	Inmaduro	Peróxido de hidrógeno	M2
T11	Inmaduro	Peróxido de hidrógeno	M3
T12	Inmaduro	Peróxido de hidrógeno	M4
T13	Inmaduro	Agua estéril	M1
T14	Inmaduro	Agua estéril	M2

T15	Inmaduro	Agua estéril	M3
T16	Inmaduro	Agua estéril	M4

5.4 Resultados y discusión

La prueba de Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza demostró que no existe efecto significativo de los tratamientos sobre la tasa de desarrollo de embriones ($P \leq 0.05$). Únicamente se observó un desarrollo de embriones en las semillas de frutos inmaduros embebidas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% y en semillas de frutos inmaduros pretratadas con agua estéril (Figura 33), al igual que en la germinación *in vitro* de semillas (Capítulo 4) La precaria germinación de los embriones puede deberse a la baja viabilidad observada con la prueba de cloruro de tetrazolio (CTT) al 1% (Capítulo 4) y a la falta de longevidad en la semilla (Panetta, 1988).

Cuadro 19. Prueba de Kruskal y Wallis para el análisis de la varianza no paramétrica y medidas de estadística descriptiva sobre la variable “Tasa de desarrollo de embriones” de blanco o criollo cultivados *in vitro* (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Tratamiento	T.E.G (embriones germinados /tratamiendo)	D.E.	CV	gl	H	p
Valor medio						
1	3	0	0	15	10.04	0. 4514
10	0	0	Sd			
11	0	0	Sd			
12	0	0	Sd			
13	3	0	0			

14	3	0	0
15	0	0	Sd
16	1	0	0
2	1	0	0
3	0	0	Sd
4	0	0	Sd
5	0	0	Sd
6	0	0	Sd
7	0	0	Sd
8	0	0	Sd
9	0	0	Sd

T.E.G= Tasa de embriones germinados; D.E= Desviación estándar; C.V= Coeficiente de variación; H= Estadístico de prueba Krukal y Wallis ($P \leq 0.05$)

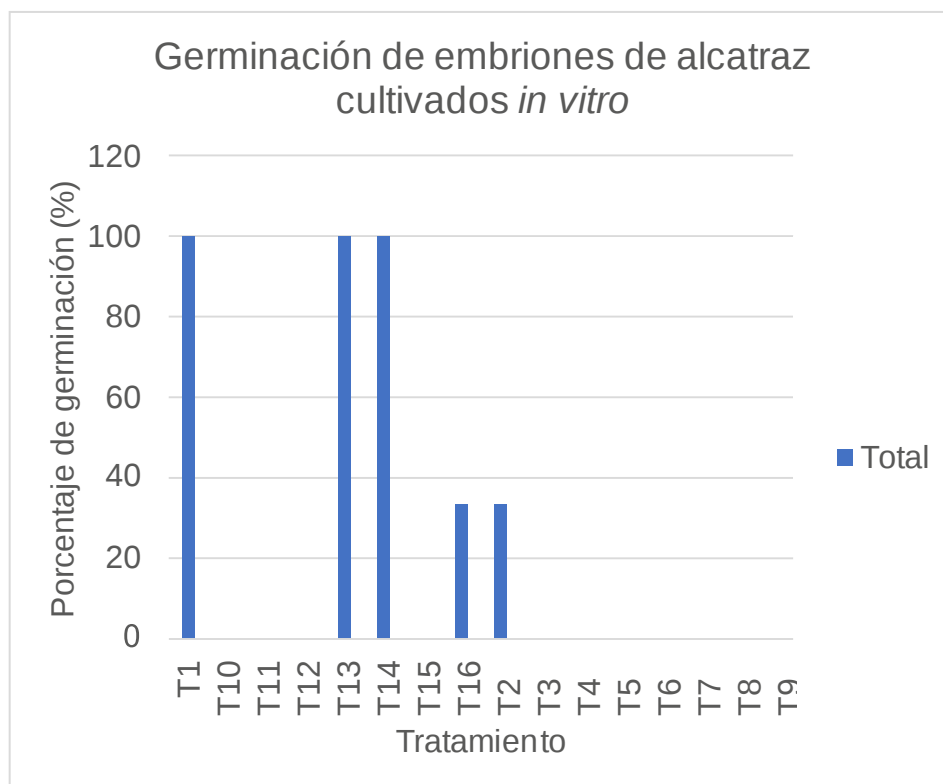


Figura 32. Porcentaje de germinación de embriones de alcatraz blanco o criollo (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) cultivados *in vitro*.

Los embriones se desarrollaron de forma normal, la germinación del embrión comenzó con la protrusión de la radícula (Figura 32a), posteriormente se desarrolló la plúmula (Figura 32 b-d) y las raíces adventicias (Figura 33)

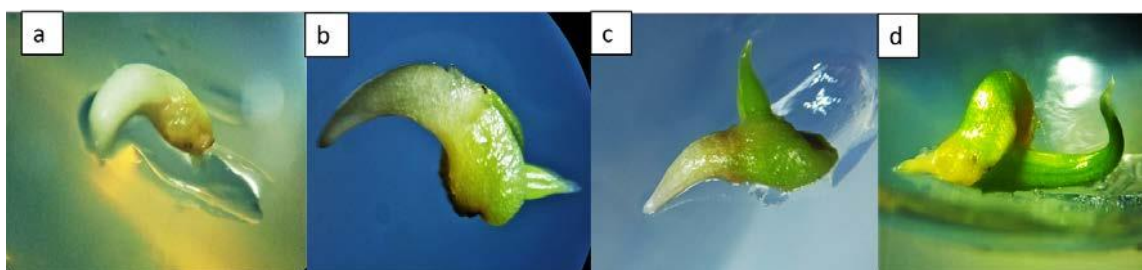


Figura 33. Secuencia de desarrollo *in vitro* de un embrión aislado de semilla de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) proveniente de fruto inmaduro y embebida en agua estéril.



Figura 34. Plántula de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng) obtenida mediante rescate de embriones. El embrión se extrajo de una semilla de fruto inmaduro embebida en agua estéril.

5.5 Conclusiones

La germinación de los embriones no se vió afectada por la composición del medio de cultivo, los pretratamientos a la semilla ni la maduración de los frutos del cual provienen, sin embargo, se logró obtener plántulas libres de enfermedades a partir del rescate de embriones. A pesar de que las plantas de alcatraz presentan bajos porcentajes de abortos de los frutos, las semillas pierden viabilidad rápidamente. El rescate de embriones es una herramienta útil en el estudio de los factores que afectan la germinación de embriones de alcatraz.

5.6 Literatura citada

- Chi, Y. H. (1990). *A study of incompatibility within the genus Zantedeschia: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Horticultural Science at Massey University, Palmerston North, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
- Ghimire, B. K., Yu, C. Y., Kim, H. J., & Chung, I. M. (2012). Karyotype and nucleic acid content in *Zantedeschia aethiopica* Spr. and *Zantedeschia elliottiana* Engl. *African Journal of Biotechnology*, 11(53), 11604-11609. DOI: [10.5897/AJB12.061](https://doi.org/10.5897/AJB12.061)
- Guttman, Y., Joshi, J. R., Chriker, N., Khadka, N., Kleiman, M., Reznik, N., Wei Z., Kerem Z. & Yedidia, I. (2021). Ecological adaptations influence the susceptibility of plants

- in the genus *Zantedeschia* to soft rot *Pectobacterium* spp. *Horticulture Research*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00446-2>
- Kubo, T., Inaba, K., & Mori, G. (2006). Embryo culture for the production of interspecific hybrids in *Zantedeschia*. 地域総合科学研究センター報告, (1), 35-38. <http://id.ndl.go.jp/bib/9505191>
- Ngamau, K. (2001). Development of an in vitro culture procedure using seeds from *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess' as explants. *Gartenbauwissenschaft*, 66(3), 133-139 https://www.pubhort.org/ejhs/2001/file_2937.pdf
- Panetta, F. D. (1988). Studies on the seed biology of arum lily (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.). *Seeds*, 3, 4. <https://caws.org.nz/PPQ34/PPQ%2003-4%20pp169-171%20Panetta.pdf>
- Sharma, D. R., Kaur, R., & Kumar, K. (1996). Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica*, 89(3), 325-337. <https://doi.org/10.1007/BF00022289>
- Shen, X., Gmitter, F. G., & Grosser, J. W. (2011). Immature embryo rescue and culture. En Thorpe T., Yeung E. (eds) *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 710 (75-92). *Humana Press*. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_7
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2004). *Plant development and biotechnology*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780203506561>
- Wei, Z., Zhang, H., Wang, Y., Li, Y., Minxiong, Xian, W. & Zhou, D. (2017). Assessing genetic diversity and population differentiation of colored Calla Lily (*Zantedeschia* Hybrid) for an efficient breeding program. *Genes* 8(6), 168. <https://doi.org/10.3390/genes8060168>
- Yao, J. L., Cohen, D., & Rowland, R. E. (1995). Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. *Plant science*, 109(2), 199-206. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04163-O](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04163-O)
- Yao, J. L., Rowland, R. E., & Cohen, D. (1994). Karyotype studies in the genus *Zantedeschia* (Araceae). *South African journal of botany*, 60(1), 4-7. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)30653-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)30653-6)
- Yao, J. L., & Cohen, D. (1996). Production of triploid *Zantedeschia* hybrids using embryo rescue. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24(4), 297-301. <https://doi.org/10.1080/01140671.1996.9513965>