



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 47
ACCESIONES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.)
Spreng)**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**Presenta
MAYRA JOSEFINA CASTILLO GIL**

**Bajo la supervisión de la Dra. MARGARITA GISELA PEÑA
ORTEGA**



Chapingo, Estado de México, mayo de 2023.



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 47 ACCESIONES
DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng)**

Tesis realizada por **MAYRA JOSEFINA CASTILLO GIL**, bajo la dirección y asesoría del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTORA:


Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

CODIRECTOR:


Dr. JUAN GUILLERMO CRUZ CASTILLO

ASESOR:


Dr. JUAN MARTÍNEZ SOLÍS

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL SUMMARY	xi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Hipótesis	2
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Origen y distribución	3
2.2 Taxonomía	3
2.3 Características y descripción botánica	4
2.4 Importancia económica y producción de alcatraz	5
2.5 Panorama comercial	6
2.6 Mejoramiento genético en <i>Zantedeschia</i>	7
2.7 Caracterización de germoplasma	8
2.7.1 Caracterización morfológica	9
2.7.2 Caracterización molecular	9
2.7.2.1 Marcadores moleculares	10
2.7.2.2 Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs, Inter Simple Sequence Repeats)	14
2.7.3 Agrupamiento de genotipos	16
2.8 LITERATURA CITADA	19
3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE 47 ACCESIONES DE ALCATRAZ (<i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng)	28
3.1 RESUMEN	28
3.2 ABSTRACT	29
3.3 INTRODUCCIÓN	30

3.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.4.1	Caracterización de material vegetal	32
3.4.2	Caracterización morfológica	34
3.4.3	Genotipos empleados	37
3.4.4	Análisis de estadístico.....	45
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.5.1	Análisis de Componentes Principales	46
3.5.2	Análisis PCA de caracteres morfológicos cuantitativos.....	46
3.5.3	Análisis PCA de los rasgos morfológicos cualitativos	50
3.5.4	Análisis de conglomerados	53
3.6	CONCLUSIONES	57
3.7	AGRADECIMIENTOS.....	57
3.8	LITERATURA CITADA	58
4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 47 ACCESIONES DE ALCATRAZ (<i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng).....	61
4.1	RESUMEN.....	61
4.2	ABSTRACT.....	62
4.3	INTRODUCCIÓN.....	63
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.4.1	Colecta de material vegetal.....	65
4.4.2	Genotipos empleados	66
4.4.3	Extracción de ADN.....	67
4.4.4	Cuantificación de la pureza y calidad del ADN.....	68
4.4.5	Amplificación y separación de patrones ISSR.....	70
4.4.6	Separación de productos amplificados.....	73
4.4.7	Análisis estadístico.....	73
4.4.7.1	Análisis de agrupamiento	73
4.4.7.2	Descriptiva de marcadores	74
4.4.7.3	Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).	74

4.4.7.4	Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver.....	74
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.5.1	Obtención de perfiles ISSRs	75
4.5.2	Análisis de agrupamiento	79
4.5.3	Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	82
4.5.4	Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver	83
4.6	CONCLUSIONES	85
4.7	AGRADECIMIENTOS.....	85
4.8	LITERATURA CITADA	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Comparación de algunas características sobresalientes de las principales técnicas de marcadores moleculares.....	11
Cuadro 2.	Aplicaciones de marcadores de ADN para la mejora en diversas especies vegetales.	12
Cuadro 3.	Ubicación geográfica de los genotipos de alcatraz (<i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng).	32
Cuadro 4.	Sitios de caracterización del material vegetal de <i>Z. aethiopica</i>	34
Cuadro 5.	Caracteres morfológicos evaluados <i>in situ</i> en 47 accesiones de <i>Z. aethiopica</i>	35
Cuadro 6.	Genotipos de <i>Z. aethiopica</i> manejados en la caracterización molecular con marcadores ISSR.....	37
Cuadro 7.	Descripción de líneas utilizadas de alcatraz (<i>Z. aethiopica</i>) en la caracterización molecular.	40
Cuadro 8.	Descripción de las variedades derivadas, utilizadas de alcatraz (<i>Z. aethiopica</i>) en la caracterización molecular.	40
Cuadro 9.	Los autovalores, la proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 19 caracteres cuantitativos morfológicos de <i>Z. aethiopica</i>	46

Cuadro 10. Autovalores de las variables cuantitativas morfológicas de 47 UBC´s de <i>Z. aethiopica</i> , para los primeros cinco componentes principales (PC).....	48
Cuadro 11. Autovalores y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 20 caracteres cualitativos morfológicos de <i>Z. aethiopica</i>	50
Cuadro 12. Autovalores de las variables cualitativas morfológicas de 47 UBC´s de <i>Z. aethiopica</i> , para los primeros cinco componentes principales (PC).....	51
Cuadro 13. Intervalo de valores de la relación 260/280 (λ) indicador de la pureza del ADN aislado.	68
Cuadro 14. Concentración en ng/ μ L y relación 260/280 de tejido vegetal de las 47 UBCs de <i>Z. aethiopica</i>	69
Cuadro 15. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular colectas de alcatraz.	71
Cuadro 16. Ciclos y temperaturas de amplificación de la PCR para la obtención de los patrones ISSR.	72
Cuadro 17. Composición de la mezcla maestra de reacción estándar para PCR en un volumen final de 25 μ L.....	72
Cuadro 18. Descriptiva de 22 iniciadores ISSR utilizados para la obtención de perfiles moleculares de alcatraz.....	78
Cuadro 19. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de accesiones de alcatraz o cala (<i>Z. aethiopica</i>) basado en datos ISSR.....	82
Cuadro 20. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en cuatro poblaciones de <i>Z. aethiopica</i>	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principio básico de los RAPD´s (A) e ISSR´s (B). Las flechas señalan la dirección de síntesis de la cadena durante la reacción de la PCR; el fragmento amplificado está representado a un lado de las cadenas originales. En (B) se han incluido dos nucleótidos suplementarios arbitrarios en el extremo 5' del iniciador. Elaboración propia con base en los datos de (Munive et al., 2014).	15
Figura 2. Diversidad morfológica de tamaño y forma de flores criollas entre las accesiones evaluadas de alcatraz <i>Z. aethiopica</i> :.....	41

Figura 3. Líneas de alcatraz <i>Z. aethiopica</i> : A): Espata (vista lateral) de “Green Goddess”; B): Espata (vista lateral desde arriba) de “Green Goddess”; C): Espata (vista lateral) de “Hércules”; D): Espata (vista lateral desde arriba) de “Hércules”; E): Espata (vista lateral) de seedlings de “Pink Mist”; F): Espata (vista lateral desde arriba) de seedlings de “Pink Mist”	42
Figura 4. Híbridos de alcatraz <i>Z. aethiopica</i> : A: Espata (vista lateral) de “Deja Vu”; B: Espata (vista lateral desde arriba) de “Deja Vu”; C: Espata (vista lateral) de “Utopía”; D: Espata (vista lateral desde arriba) de “Utopía”; E: Espata (vista lateral) de “Sublime”; F: Espata (vista lateral desde arriba) de “Sublime”	43
Figura 5. Diversidad morfológica de tamaño, forma, maculaciones y color de las características de las hojas entre las accesiones evaluadas de alcatraz <i>Z. aethiopica</i> : A: Limbo (haz) de “Hércules”; B: Limbo maculado (haz) de “Hércules”; C: Limbo (haz) de tipo “Green Goddess”; D: Limbo maculado (haz) de tipo “Green Goddess”; E: Limbo maculado (haz) de “Sublime”; F: Limbo (haz) de “Criollo”	44
Figura 6. Biplot de 47 accesiones de alcatraz para los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2). Las líneas indican la contribución (magnitud y dirección) de las 19 características morfológicas cuantitativas en los componentes principales CP1 y CP2.	49
Figura 7. Biplot de 47 accesiones de alcatraz para los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2). Las líneas indican la contribución (magnitud y dirección) de las 20 características morfológicas cualitativas en los componentes principales CP1 y CP2.	53
Figura 8. Dendrograma conformado a partir de datos cuantitativos, mediante el método de agrupamiento Ward, para 47 colectas de alcatraz.....	55
Figura 9. Dendrogramas conformado a partir de datos cualitativos mediante el método de agrupamiento Ward, para 47 colectas de alcatraz.....	56
Figura 10. Sitios geográficos de colectas de tejido vegetal de alcatraz, procedentes de la zona centro-oriente de México.	66
Figura 11. Perfiles moleculares de ISSR obtenidos con los iniciadores: A) ISSR 1; B) ISSR 2; C) ISSR 6; D) ISSR 8; E) 17899 A y F) 17898 en 47 colectas de alcatraz. Marcador de peso molecular (1 Kb) en ambos extremos.	76
Figura 12. Dendrograma construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard entre muestras de <i>Z. aethiopica</i>	81

A Eudocia Castillo, Carmelo, Bolivar,
Sebastián y Fergus, con amor.

A Yair Cruz por su imparable compañía, orientación y amor.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Instituto de Horticultura**, por mi formación como Maestro en Ciencias en Horticultura.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por brindarme el financiamiento para la realización de mis estudios de maestría.

A mi Comité Asesor integrado por el **Dra. Margarita Gisela Peña Ortega**, **Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo** y el **Dr. Juan Martínez Solís**, quienes me apoyaron en todas las etapas de la investigación, por su tiempo y valiosa orientación para tomar las mejores decisiones.

Al técnico del Laboratorio de Marcadores Moleculares **Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández** por su apoyo y enseñanza durante el desarrollo de la etapa experimental del presente trabajo y particularmente al **M.C. Placido Facundo Angel** por su mano amiga en el momento requerido.

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 47 ACCESIONES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng)

El alcatraz o cala es una planta ornamental originaria del sur de África. En México, se cultiva principalmente el blanco o criollo y actualmente se cuenta con tres variedades de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) K. Spreng) generadas como flor de corte que representa un alto valor comercial en las zonas rurales de México. El presente trabajo tuvo como objetivos la caracterización morfológica y molecular de 47 accesiones de alcatraz provenientes de las localidades de La Perla, Tuzantla y Elotepec pertenecientes al estado de Veracruz y el sitio de Chapingo, del municipio de Texcoco, Estado de México. La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante la evaluación *in situ* de 40 caracteres morfológicos establecidos en la “Guía Técnica para la Descripción Varietal de la Cala” del SNICS. Los resultados obtenidos en las variables cuantitativas fueron comparados mediante análisis multivariado, en el cual los valores propios indicaron que la mayoría de los rasgos cuantitativos relacionados con longitud y anchura del limbo, altura y longitud de la espata, longitud del peciolo y altura de la planta, contribuyeron en mayor medida a la diversidad total del germoplasma, mientras que en el caso de las variables cualitativas aquéllas relacionadas con el color de la espata, el espádice y los tallos contribuyeron en mayor grado a la variabilidad observada. Los marcadores morfológicos detectaron diversidad genética entre UBC´s y las diferenciaron mediante un análisis de conglomerados por dendrograma con el programa SAS/ STAT® versión 9.4. La caracterización molecular se llevó a cabo por medio de la amplificación del ADN mediante PCR con el uso de 22 marcadores tipo ISSR, obteniendo un polimorfismo general de 83.51 %. El análisis de varianza molecular (AMOVA) ($P < 0.0001$) reveló la presencia de un grado significativo de variabilidad genética, en su mayoría compartimentada dentro poblaciones de accesiones y un índice de información de Shannon-Weaver (I) con un valor general de $I=0.69$ entre las cuatro poblaciones colectadas y analizados usando el software InfoGen®. Los resultados obtenidos indican que los marcadores moleculares ISSR son adecuados para identificar variación intraespecífica en *Z. aethiopica*. El iniciador ISSR2 aportó el mayor contenido de información polimórfica por lo que resultó ser el más adecuado para la identificación de genotipos.

Palabras clave: *Z. aethiopica*, accesiones, caracterización, ISSR, SNICS.

GENERAL SUMMARY

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 47 ACTIONS OF ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng)

The alcatraz or calla is an ornamental plant native to southern Africa. In Mexico, it is cultivated mainly the white calla, as well as a landrace there are three varieties of alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) K. Spreng) grown in Mexico as a cut flower. Which has a high commercial value in rural areas of Mexico. The present research had as objectives the morphological and molecular characterization of 47 alcatraz accessions from the localities of La Perla, Tuzantla and Elotepec located at Veracruz province and the site of Chapingo, in the municipality of Texcoco, situate in State of Mexico. Morphological characterization was carried out by in situ evaluation of 40 morphological characters established in the "Technical Guide for the Varietal Description of Cala" of the SNICS. The results obtained in the quantitative variables were compared by multivariate analysis, in which the eigenvalues indicated that most of the quantitative traits related to blade length and width, spathe height and length, petiole length and plant height, contributed most to the total diversity of the germplasm, while in the case of qualitative variables, those related to spathe color, spadix and stems contributed the most to the observed variability. The morphological markers detected genetic diversity among UBC's and differentiated them by means of a dendrogram cluster analysis with the SAS/ STAT® version 9.4 program. Molecular characterization was carried out by DNA amplification by PCR with the use of 22 ISSR markers, obtaining an overall polymorphism of 83.51 %. The analysis of molecular variance (AMOVA) ($P < 0.0001$) revealed the presence of a significant degree of genetic variability, mostly compartmentalized within populations of accessions and a Shannon-Weaver information index (H') with an overall value of $H'=0.69$ among the four populations collected and analyzed using InfoGen® software. The results obtained indicate that ISSR molecular markers are suitable for identifying intraspecific variation in *Z. aethiopica*. The ISSR2 primer provided the highest polymorphic information content and was therefore the most suitable for genotype identification.

Key words: *Z. aethiopica*, accessions, characterization, ISSR, SNICS

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El alcatraz o cala de la familia *Araceae* originalmente tenía una distribución enteramente en el noreste y el sur de África. Sin embargo, luego de su introducción en Europa como plantas ornamentales en el siglo XVII, varias especies se naturalizaron ampliamente en Europa, América, Oceanía y Asia (Cruz et al., 2001). Introducida en México durante la época colonial, se puede encontrar en los bosques de pino-encino y mesófilos de montaña. Las especies y los cultivares son muy apreciados y se cultivan con frecuencia como plantas atractivas debido a sus vívidas flores y hojas. La producción de flores es una de las actividades productivas más diseminada en el medio rural (Trejo et al., 2014) que se realiza sin excepción en todas las regiones agroecológicas de México. La megadiversidad existente genera un gran potencial para esa actividad, debido a las condiciones climáticas favorables de algunas regiones (ASERCA, 2008). De las especies del género *Zantedeschia* (*Z. aethiopica*, *Z. odorata*, *Z. elliottiana* y *Z. rehmannii*) (He et al., 2020), en México se cultiva principalmente *Z. aethiopica* (L) K. Spreng o alcatraz blanco siendo ésta la de mayor importancia. Sin embargo, su conocimiento agronómico es limitado (Cruz et al., 2008).

Los principales países productores de alcatraz son: Estados Unidos de Norteamérica, Nueva Zelanda, e Italia, donde se identifican bajo dos sistemas: protegida o a cielo abierto, como ocurre en áreas con clima templado (Wright & Burge, 2000). 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 forma parte de la lista de cultivos de importancia comercial por ser muy apreciado en el mercado nacional (SEFIPLAN, 2011; Trejo et al., 2014). Aunque México ocupa el cuarto lugar del mundo en el área ornamental cultivada con 23,417 hectáreas con un 75 % a cielo abierto y un 25 % por ciento en invernaderos o viveros (UAM, 2016), no es uno de los países más importantes productores ni tampoco se considera un generador de variedades o cultivos decorativos.

En la investigación realizada por Trejo et al. (2014) mostraron que los resultados obtenidos revelan que los productores están buscando nuevas opciones para obtener ingresos económicos, pues se niegan a abandonar el cultivo de alcatraz. Además del alcatraz criollo existen cultivares novedosos que cumplen con las características que exige el mercado nacional como las primeras variedades mexicanas registradas ante el SNICS entre 2016 y 2021: 'Deja Vu' (Cruz & Torres, 2017), 'Utopía' y 'Sublime' (Cruz & Hernández, 2022). De esta forma, el registro de nuevas variedades abre la posibilidad de competencia e innovación para los productores de alcatraces (UAM, 2016). Dado que hasta el momento no hay antecedentes sobre caracterización molecular de germoplasma de alcatraces en México, el objetivo de este proyecto fue realizar la caracterización morfológica y molecular de 47 colectas con el propósito de generar información que ayude en el desarrollo de un programa de mejoramiento genético del cultivo.

1.1 Objetivos

Objetivo General

Explorar la variabilidad morfológica y molecular de 47 accesiones de *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng

Objetivos Específicos

Caracterizar morfológica y molecularmente colectas de *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.

Generar información que permita contribuir en el desarrollo de programas de conservación y mejoramiento genético de *Zantedeschia aethiopica* (L.).

1.2 Hipótesis

La existencia de variabilidad morfológica en *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng, demuestra la presencia de variabilidad genética entre accesiones.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución

Las calas son monocotiledóneas ornamentales originarias del sur de África (González et al., 2003), el género *Zantedeschia* está confinado a las zonas templadas frías ubicadas en el continente africano (Sánchez, 2001), prosperando en el sur (Cape Province, Orange Free State, Natal, Swaziland) pero también se extiende entre Zimbabwe, Malawi, Zambia, Angola y Nigeria (Letty, 1973). El nombre del género se dio en honor al botánico italiano Giovanni Zantedeschi por el británico alemán Kurt Sprengel, y está reconocida en el mundo con el nombre de “Cala” del griego “Kalos” (“bonito”). También fue conocida con el nombre de “Richardia” (Jacobs, 1997), otros de sus nombres comunes son: cartucho, aro de Etiopia, lirio cala, o cala lili (Cruz et al., 2008). En México se cultiva en todo el país siendo una de las especies ornamentales más populares. En forma silvestre se puede localizar en la región de bosque mesófilo y a lo largo de canales de riego (Vibrans, 2009).

2.2 Taxonomía

En la familia *Araceae* el género *Zantedeschia* involucra ocho especies de plantas herbáceas perennes, todas con producción de flores enormes y llamativas, por lo que con frecuencia se plantan para flor de corte con fines estéticos (Slaughter et al., 2012).

Sánchez (2001) describe la taxonomía del alcatraz de la siguiente manera:

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Espermatophyta</i>
Subdivisión:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Monocotyledonae</i>
Orden:	<i>Spadiciflorae</i>
Familia:	<i>Araceae</i>
Subfamilia:	<i>Philodendroidae</i>
Tribu:	<i>Zantedeschieae</i>

Género: *Zantedeschia*
Especies: (*Z. aethiopica*, *Z. rehmannii*, *Z. jucunda*, *Z. elliotiana*, *Z. petlandii*, *Z. albomaculata* y *Z. odorata*)

2.3 Características y descripción botánica

El género *Zantedeschia* fue citado por primera vez por Sprengel en 1826 y revisado posteriormente por otros especialistas como Letty (1973) y Perry (1989) (Chahin et al., 2000). El género *Zantedeschia* se ha dividido en dos grupos de acuerdo con características tales como su órgano de reserva, persistencia del follaje, época de floración (Snijder & Tuyl, 2002; Torres, 2013), morfología, hábitos de crecimiento y adaptación a diferentes condiciones climáticas (Armitage, 1993; Torres, 2013; Wei et al., 2017). La sección *Zantedeschia* comprende únicamente a *Z. aethiopica* (alcatraz blanco), especie perenne cuyo hábitat natural son zonas húmedas donde permanece siempre verde (Snijder & Tuyl, 2002), mientras que la sección *Aestivae* está formada por los alcatraces de color como *Z. rehmannii*, *Z. elliotiana*, *Z. albomaculata*, *Z. jucunda*, *Z. pentlandii* y *Z. odorata* (Wei et al., 2017). El follaje de estas especies sufre senescencia completa después del verano y no toleran suelos con exceso de humedad (Snijder & Tuyl, 2002).

Z. aethiopica posee raíces carnosas, adventicias, ramificadas provenientes de un rizoma del cual parten hojas y pedúnculos florales (Vibrans, 2009), las raíces principales son blancas, gruesas y simples (Sánchez, 2001). El tallo es un rizoma tuberoso del cual surgen hojas arrosetadas, tiene un hábito de crecimiento simpódico con yemas dominantes que emergen primero de los rizomas produciendo tallos primarios (Paredes, 2006). Presenta limbos acorazonados, con una longitud de 28 a 60 cm y una anchura de 5 a 25 cm soportado por un peciolo esponjoso de 30 a 100 cm de largo (Torres, 2013); la base es una vaina membranosa, pudiendo tener manchas claras o poco apreciables. Las hojas pueden presentar puntos traslúcidos, un fenómeno conocido como maculación (Jacobs, 1997; Torres, 2013).

El tallo floral carnosos da origen a una inflorescencia rodeada por su espata (Jacobs, 1997). La parte decorativa llamada espata envuelve un espádice, eje donde están ubicadas las flores verdaderas. Según Salinger (1991) y citado por Torres (2013) el espádice tiene flores masculinas en la parte superior y femeninas por debajo de éstas y las flores son unisexuales y carentes de perianto (Sánchez, 2001). 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 *Zantedeschia* son coriáceas, subglobosas u ovoides, a menudo comprimidas y cada fruto contiene de 1 a 12 semillas (Letty, 1973). Se reproduce por semillas y por rizomas, lo que facilita su establecimiento en nuevas zonas (DEPI, 2012; Tenorio, 2014).

2.4 Importancia económica y producción de alcatraz

A nivel mundial los países productores de alcatraz son: Estados Unidos de Norteamérica, Nueva Zelanda, e Italia. La producción puede ser bajo dos sistemas, protegida o a cielo abierto, como ocurre en áreas con clima templado (Wright & Burge, 2000).

Los principales estados productores en México son Baja California Sur, Colima, Chiapas, Jalisco, México, Oaxaca, Puebla, y Veracruz (Cruz & Hernández, 2022). La entidad principal es el estado de México con una superficie cosechada de 6,055 hectáreas con un rendimiento de 58 320 tallos florales y un valor de la producción de \$ 753 300.00 (Villegas, 2021). Puebla siembra 4,033 hectáreas y Morelos 1,494 hectáreas. Para el 2018 México cultivaba principalmente el alcatraz criollo o blanco con un valor de la producción de 608,370 pesos (SIAP, 2018).

Los alcatraces tienen una gran demanda en los mercados mexicanos e internacionales, ya que su producción puede generar ingresos adicionales para los agricultores que viven en regiones tropicales (Cruz et al., 2008).

Las variedades que muestran distintas tonalidades de color resultan más atractivas a los consumidores que buscan cultivares vistosos con flores llamativas (UAM, 2016).

En la actualidad el alcatraz y sus híbridos son muy valorados en el mercado nacional, por lo que, al introducir nuevas variedades alcatraz de varios colores se aguarda que produzca un nuevo mercado de exportación (Leszczyńska & Borys, 2002; Macias, 2017). De esta forma, el registro de nuevas variedades abre la posibilidad de competencia e innovación para los productores de alcatraces. (UAM, 2016).

2.5 Panorama comercial

La producción de flores es una de las actividades productivas más diseminadas en el entorno rural realizada sin excepción nuestro país. (Trejo et al., 2014). La mega diversidad existente en México es un gran potencial para la actividad, debido a las condiciones climáticas favorables de varias regiones (Trejo et al., 2014). El género *Zantedeschia* ofrece una amplia diversidad de usos extensos para industrias ornamentales como flor de corte, para producción en maceta o para jardín y es preferida por los floristas debido a los colores de sus espatas.

En México se cultiva principalmente a cielo abierto el alcatraz blanco (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) o criollo, en ámbitos templados y húmedos, por lo que la experiencia en otros cultivares es limitada (Cruz et al., 2008). Debido a la alta demanda en los mercados mexicanos e internacionales, su producción puede generar ingresos adicionales para los agricultores (Cruz et al., 2008).

Por lo que el uso de nuevas variedades mexicanas como “Deja Vu”, “Utopía” y “Sublime” mejoraría las posibilidades competitivas e innovadoras de los productores de alcatraz (UAM, 2016). Con el objetivo de contribuir al desarrollo socioeconómico de las poblaciones rurales y el posicionamiento de México en la obtención de nuevas variedades con colores de espata más vistosos mediante el mejoramiento genético del alcatraz para la obtención de nuevas variedades mejoradas, es conveniente caracterizar morfológica y molecularmente las distintas colectas de que se dispone a la fecha estrategia que podría permitir la identificación de algunas accesiones que pudieran explotarse directamente como nuevas variedades o bien como base para desarrollar un programa de mejoramiento genético.

2.6 Mejoramiento genético en *Zantedeschia*

En los últimos años, los programas de mejoramiento genético de países como Holanda, Nueva Zelanda y Australia, han dado origen a numerosos híbridos y cultivares con una amplia gama de colores, tamaños y presentaciones para el cultivo en macetas y flor de corte (Hernández, 2013; Zamorano, 2009).

Dentro del grupo perenne los cultivares más vistosos de *Z. aethiopica* son “Green Goddess”, “Green Desire”, “Red Desire” y “Hércules”. “Green Desire” fue producida en Holanda por la compañía Hoff Quality First y es muy similar a “Green Goddess”, que ya no paga regalías (Villegas 2021). Esa misma compañía desarrolló “Red Desire”, el cual presenta tonos rosados. Por su parte “Hércules”, variedad registrada en Estados Unidos es un cultivar sumamente vigoroso que puede alcanzar hasta 1.80 m de altura (Villegas 2021).

La variedad de alcatraz “Deja Vu” es la primera registrada en México ante el Sistema Nacional de Certificación e Inspección de Semillas, con título de obtentor número 1478 (Cruz & Torres, 2017), pero también se dispone de las variedades “Utopía” (Universidad Autónoma Chapingo, registro de obtentor número 2720) y “Sublime”, generada en Huatusco, Veracruz, México, con constancia de presentación ante la Secretaría Técnica del SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas) (SADER) con el número CP 2793. Obtenida en Elotepec, municipio de Huatusco, Veracruz (Cruz & Hernández, 2022), este desarrollo tecnológico fue el resultado de la búsqueda de accesiones con colores de espata muy vistosos con gran potencial para su comercialización (UAM, 2016).

A nivel mundial Nueva Zelanda es el país que desarrolla el programa de mejoramiento de calas o alcatraces caducifolios de mayor relevancia. Los cultivares de *Zantedeschia aethiopica* perennifolios, grupo al que pertenece la variedad “Deja Vu” han sido desarrollados en Holanda y Estados Unidos (Cruz & Torres, 2017).

2.7 Caracterización de germoplasma

Las variedades cultivadas se caracterizan por una alta variabilidad morfológica y genética y presentan una gran cantidad de sinónimos y homónimos. Esto requiere la introducción de un sistema rápido y preciso para la identificación de variedades. En el pasado, el reconocimiento de los cultivares se basaba únicamente en el análisis de los rasgos morfológicos, sin embargo, estos están muy influenciados por las condiciones ambientales, por lo que a lo largo de los años se desarrollaron varios métodos basados en el análisis de ADN, que permitieron una identificación varietal más precisa y confiable (Sion et al., 2021).

2.7.1 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los recursos genéticos se refiere al proceso mediante el cual las accesiones se identifican unívocamente a través de una descripción sistemática de los caracteres morfológicos. Los rasgos deben tener una alta heredabilidad y poder de discriminación tanto a nivel taxonómico como agronómico, y deben ser claramente distinguibles, fácilmente registrables y expresados de manera exacta y uniforme (Ganino et al., 2006).

En 2001 la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) proporcionó una lista de referencia de marcadores para una metodología estandarizada de recopilación de datos. Estas directrices de examen se aplican a todas las variedades de multiplicación vegetativa de *Zantedeschia* Spreng de la familia de las aráceas (UPOV, 2001). Los descriptores morfológicos siguen siendo la base para una primera identificación varietal, pero su dependencia de las etapas de desarrollo de la planta, las técnicas de cultivo y otros factores ambientales han llevado progresivamente a que éstos se usen en combinación con las técnicas de análisis de ADN, las cuales se han vuelto esenciales en el estudio de la diversidad genética en diversos cultivos (Rossi et al., 2020). Hoy en día, los marcadores moleculares resueltos a través de plataformas automáticas se han vuelto particularmente importantes en el análisis de mapeo de poblaciones, estudios de asociación y enfoques de genética funcional.

2.7.2 Caracterización molecular

La diversidad genética de una especie puede medirse de diferentes formas, la más común es mediante descriptores morfológicos. No obstante, las condiciones ambientales influyen en la manifestación de ciertos caracteres fenotípicos como el color de los tallos y flores, se puede interpretar erróneamente como variabilidad genética dentro de una especie, cuando lo que realmente sucede es una adaptación diferencial entre poblaciones (Marshall et al., 2001). Con frecuencia estos marcadores sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando está llega a su estado adulto (Phillips et al., 1995).

Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que supera en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos (Kessel, 2008), pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, pueden ser aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa, 2006; Kessel, 2008).

2.7.2.1 Marcadores moleculares

Un marcador molecular o de ADN es la diferencia en la secuencia de nucleótidos de ADN entre organismos o especies individuales, que está cerca o estrechamente vinculada a un gen objetivo que expresa un rasgo. Por lo general, el gen objetivo, el rasgo expresado o la función biológica y el marcador molecular estrechamente vinculado asociado se heredan juntos (Collard et al., 2005).

La ubicación genómica específica del marcador molecular dentro de los cromosomas denominada locus o loci puede ser conocida o desconocida. Cabe señalar que los marcadores moleculares o de ADN no influyen en los rasgos asociados con la expresión o función del gen o genes vinculados (Reddy et al., 2021). Los marcadores de ADN pueden ser útiles para indicar las diferencias genotípicas individuales en especies iguales o diferentes, si existen diferencias denominadas polimorfismos en las secuencias de nucleótidos del marcador entre individuos o especies (Lincoln et al., 2018). Generalmente los polimorfismos de marcadores en los organismos son causados por mutaciones puntuales que surgen de sustituciones de un sólo nucleótido, reordenamientos que implican inserciones o eliminaciones, duplicación de secciones de ADN, translocaciones e inversiones, así como errores en la replicación del ADN que se repiten en tándem (Selvakumari et al., 2017).

Las señales de marcadores moleculares que se utilizan para revelar diferencias genóticas entre individuos se denominan marcadores polimórficos. Por otro lado, los marcadores de ADN que no pueden usarse para diferenciar entre genotipos se denominan marcadores monomórficos. Un marcador molecular ideal también debe ser altamente polimórfico, co-dominante en expresión para permitir una discriminación efectiva entre homocigotos y heterocigotos, debe ser altamente reproducible y ser posible compartir los datos generados entre laboratorios (Kordrostami & Rahimi, 2015). Los marcadores de ADN se clasifican en varias clases según el método de detección: hibridación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcadores moleculares dependientes de la secuencia de ADN (Mullis et al., 1986). Se han comparado algunas características sobresalientes de los principales marcadores moleculares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de algunas características sobresalientes de las principales técnicas de marcadores moleculares.

Marcador	Basado en PCR	Modo de herencia	Especificidad de locus	Nivel de polimorfismo	Reproducibilidad
RFLP	No	Codominante	Sí	Medio bajo	Alto
RAPD	Sí	Dominante	No	Altura media	Bajo
SCAR	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
AFLP	Sí	Dominante	No	Alto	Medio
SSR	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
ISSR	Sí	Dominante	Sí	Alto	Medio
CpSSR	Sí	Codominante	Sí	Bajo	Alto
SAMPL	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
SRAP	Sí	Dominante	No	Altura media	Bajo
SSCP	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
CAPS	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
SNP	Sí	Codominante	Sí	Extremadamente alto	Alto
DArT	No	Dominante	Sí	Alto	Alto
EST	Sí	Dominante	Sí	Alto	Alto
STS	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto
RAMP	Sí	Codominante	Sí	Alto	Alto

Elaboración propia con base en los datos de Nadeem et al. (2018).

Las técnicas de marcadores moleculares bien establecidas, como son los marcadores de ADN amplificado arbitrariamente (AAD), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), la repetición de secuencia inter simple (ISSR) y el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), son más populares y se utilizan ampliamente en la genómica vegetal (Amiteye, 2021). Actualmente se dispone de una amplia diversidad de métodos de marcadores moleculares para genotipificar una variedad de genomas de plantas. Los marcadores moleculares o de ADN se utilizan cada vez más en estudios genómicos básicos y fitomejoramiento aplicado (Cuadro 2). Las consideraciones para decidir sobre el marcador molecular particular a utilizar se basan en la especie de planta a estudiar, el objetivo del trabajo de investigación y la disponibilidad de los recursos necesarios.

Cuadro 2. Aplicaciones de marcadores de ADN para la mejora en diversas especies vegetales.

Aplicación de marcadores moleculares	Marcador molecular utilizado	Especies de plantas	Referencias
Diversidad genética, huellas dactilares de ADN y conservación de germoplasma	DArT; ISSR y RAPD; CDDP; RAPD; ISSR: SSR y ISSR	Maíz (<i>Zea mays</i>); Ricino (<i>Ricinus communis</i>); <i>Musa</i> L. (Musáceas); <i>Gloriosa superba</i> ; arroz (<i>Oryza sativa</i> L.); <i>Zantedeschia</i> spp. y <i>Zantedeschia</i> spp.)	Badu-Apraku et al. (2021); Kim et al. (2021); Igwe et al. (2021); Tilwari y Sharma (2021); Mazumdar et al. (2020), He et al. (2020), (Zhang et al. 2009; Zhen & XU, 2013).
Evaluación de la heterosis en la cría	SSR y SNP; AFLP, RAPD y SSR; SNP; EST y SSR	Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>); maíz (<i>Zea mays</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>); arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Geng et al. (2021); Esan et al. (2021); Tomkowiak et al. (2020); Nie et al. (2019); Pavani et al. (2018).

Aplicación de marcadores moleculares	Marcador molecular utilizado	Especies de plantas	Referencias
Identificación de plantas haploides/diploides	SSR	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Rádi et al. (2020).
Análisis de segregantes a granel	SNP; SNP; SSR	Ricino; Arroz (<i>Oryza sativa</i>); Soya (<i>Glycine max</i>)	Wang et al. (2021); Yang et al. (2021); Sreenivasa et al. (2020)
Selección asistida por marcador	SSR; SRAP;	Yuca (<i>Manihot esculenta</i>); camelia oleifera	Olasanmi et al. (2021); Feng et al. (2020).
Mapeo genético y físico	SNP; SSR; SNP; SSR	Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>); cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i>); Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>); Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	Feng et al. (2021); Jegadeeswaran et al. (2021); Quezada et al. (2021), Adjebeng et al. (2020).
Mapeo y caracterización de QTL	SSR y AFLP; SSR; ISSR; SNP	Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>); <i>Capsicum annuum</i> y <i>C. frutescens</i> ; melocotón (<i>Prunus persica</i>); trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Hou et al. (2021); Li et al. (2021); Olatunji y Afalayan (2019); Rawandoozi et al. (2021), Asif et al. (2020).
Mapeo de asociaciones	SSR; SSR; SNP	Maíz (<i>Zea mays</i>); Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>); Maíz (<i>Zea mays</i>)	Jha et al. (2021); Kim et al. (2021); López et al. (2021).
Retrocruzamiento asistido por marcadores	SNP; EST y SNP	Arroz (<i>Oryza sativa</i>); Caupí (<i>Vigna unguiculata</i>)	Chen et al. (2017); Batieno et al. (2016).
Identificación híbrida	RSS; EST y SSR	Cítricos (<i>Citrus aurantifolia</i> y <i>Citrus limon</i>); <i>Elymus sibiricus</i>	Guzmán et al. (2017); Zhao et al. (2017).

Elaboración propia con base en los datos de Amiteye (2021).

Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables) (Claros, 1998). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Claros, 1998). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Ferreira, 1998; Rodríguez et al., 2019). Además, reducen el tiempo de identificación de genotipos con características asociadas a dichos marcadores genéticos sin necesidad de esperar su madurez y prueba en ambientes diferentes, actualmente se consideran una herramienta complementaria para los programas de mejoramiento genético (Valadez & Kahl, 2005).

2.7.2.2 Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs, Inter Simple Sequence Repeats)

Los ISSR's amplifican fragmentos que se ubican entre las repeticiones de secuencias simples (simple sequence repeats o SSR's), también llamadas microsatélites (Munive et al., 2014). Los ISSR son secciones genómicas flanqueadas por secuencias repetidas simples o secuencias de microsatélites. Las secuencias de microsatélites son regiones genómicas que consisten en motivos de secuencias simples de ADN cortas, generalmente de tamaño di-, tri- y tetra- o penta-nucleótidos, repetidas varias veces en tándem (Figura 1). Los ISSR son ubicuos y se distribuyen aleatoriamente por todo el genoma. El sistema de marcadores ISSR se basa en la generación de marcadores multilocus a través de la amplificación por PCR de regiones genómicas flanqueadas en cada extremo por secciones repetidas de microsatélites idénticos que están orientados de manera opuesta. El tamaño de la secuencia de nucleótidos de ADN intermedia entre los microsatélites debe estar dentro de un rango de tamaño que prácticamente permita una amplificación por PCR exitosa (Sarwant et al., 2016).

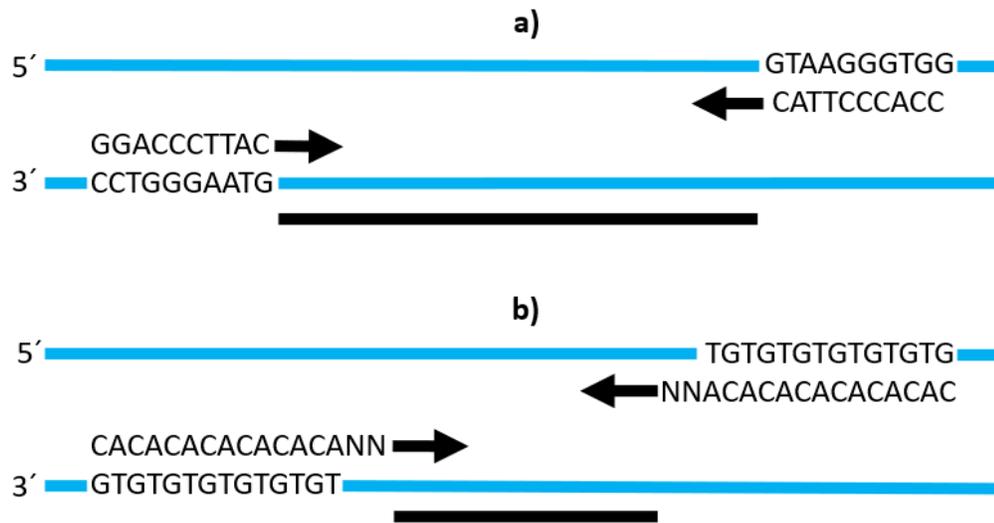


Figura 1. Principio básico de los RAPD's (A) e ISSR's (B). Las flechas señalan la dirección de síntesis de la cadena durante la reacción de la PCR; el fragmento amplificado está representado a un lado de las cadenas originales. En (B) se han incluido dos nucleótidos suplementarios arbitrarios en el extremo 5' del iniciador. Elaboración propia con base en los datos de (Munive et al., 2014).

A diferencia de muchos otros sistemas de marcadores, la reacción ISSR-PCR es una amplificación por PCR de un sólo iniciador (Sharafi et al., 2017). Los iniciadores ISSR suelen tener un tamaño de entre 15 y 30 bases y están diseñados para comprender secuencias de ADN simples repetitivas que se dirigen a secciones de microsatélites genómicos. En el análisis ISSR, los iniciadores utilizados pueden ser no anclados o anclados en el extremo 3' o 5'. El ancla del iniciador normalmente se compone de 1 a 4 nucleótidos degenerados que se superponen a las secuencias de microsatélites flanqueantes (Sharafi et al., 2017).

Un perfil de reacción de PCR de contacto que cubra el rango de temperaturas de hibridación de 45 a 60 °C ayuda a evitar tener que probar varias temperaturas diferentes con iniciadores ISSR que son difíciles de optimizar con el método de PCR estándar. Los ISSR son altamente confiables debido a la alta temperatura de hibridación y los productos de secuencia más largos (Yadav et al., 2019).

Los productos de ADN de ISSR-PCR se perfilan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida y se visualizan bajo iluminación con luz ultravioleta. Las bandas se registran como presentes o ausentes en función de tamaños particulares. Los marcadores ISSR son altamente polimórficos y se caracterizan como marcadores dominantes (Yadav et al., 2019). Para los marcadores moleculares del tipo dominantes, como RAPDs, AFLPs o ISSRs, los datos comúnmente se codifican como binarios (1 indica presencia y 0 ausencia de bandas o productos de amplificación relacionados a cada marcador) (Balzarini et al., 2010).

Los ISSR son simples, técnicamente más fáciles, menos exigentes de realizar y de bajo costo en comparación con otros sistemas de marcadores dominantes. La principal ventaja de los ISSR es que no se necesita un conocimiento previo de las secuencias de ADN para definir las secuencias de los iniciadores. Además, la aplicación de PCR hace posible que sólo se utilice una pequeña cantidad de ADN en los procedimientos analíticos ISSR. Por lo general, de 10 a 50 ng de ADN de buena calidad son suficientes para cada reacción (Padmakar et al., 2015). Los marcadores ISSR proporcionan datos altamente polimórficos y útiles para muchos objetivos de investigación. ISSR se ha aplicado para generar información valiosa en especies estrechamente relacionadas o distantes en estudios de diversidad genética y filogenia, mapeo del genoma y biología evolutiva (Thakur et al., 2016).

2.7.3 Agrupamiento de genotipos

La información sobre la estructura de las colecciones de germoplasma es de gran importancia tanto para la conservación como para la utilización de los recursos genéticos recolectados en los bancos de germoplasma.

Debido a la naturaleza diversa de los materiales de los bancos de germoplasma (variedades locales, líneas seleccionadas de las variedades locales, líneas de mejoramiento élite, variedades liberadas, parientes silvestres y reservas genéticas de diferentes áreas de origen), éstos proporcionan toda la diversidad alélica relevante necesaria para el mejoramiento de plantas (D'hoop et al., 2010). La determinación de las estructuras genéticas de las colecciones de germoplasma también es un aspecto importante de los estudios de asociación (Wang et al., 2005).

En el pasado, la determinación de la estructura genética de las colecciones de germoplasma se realizaba principalmente utilizando métodos estadísticos multivariados tradicionales, como el análisis de conglomerados, el análisis de componentes principales y el escalado multidimensional, generalmente basados en datos agronómicos (Peeters & Martinelli, 1989).

En los últimos años, se han desarrollado muchos métodos nuevos especialmente para estudiar la estructura en poblaciones naturales utilizando marcadores moleculares, por ejemplo, STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), PCA (Patterson et al., 2006) y PCO-MC (Reeves & Richards 2009). Estos métodos también se pueden utilizar para estudiar la estructura genética en colecciones de germoplasma. Sin embargo, el agrupamiento jerárquico tradicional sigue siendo un método muy popular para estudiar la diversidad genética en especies de cultivos (D'hoop et al., 2010).

Su popularidad se deriva del hecho de que requieren poco tiempo de computadora en comparación con otros métodos, hay disponibles muchos paquetes estadísticos generales, se usan con frecuencia en diferentes tipos de aplicaciones y son fáciles de entender. Además, no requiere suposiciones genéticas como Hardy-Weinberg o equilibrio de ligamiento. El agrupamiento jerárquico requiere decisiones sobre la medida de distancia, el algoritmo de agrupamiento y la evaluación de dendrogramas, entre otros.

La mayoría de las evaluaciones del desempeño de los métodos de agrupamiento jerárquico se basaron en conjuntos de datos de tamaño limitado (Milligan & Cooper, 1985). De la literatura sobre la determinación de la estructura de las colecciones de germoplasma vegetal, los métodos de agrupamiento más populares son el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) (Sokal & Michener, 1958) y el método de varianza mínima de Ward (Ward, 1963).

Las diferencias entre los algoritmos de agrupamiento jerárquico radican principalmente en cómo se definen las distancias entre pares de objetos o agrupaciones. En UPGMA, la distancia entre dos conglomerados se define como la media no ponderada de las distancias entre todos los pares de accesiones, una de cada conglomerado. En cada paso, se unen los dos grupos más cercanos. Ward emplea el enfoque de análisis de varianza (ANOVA) para calcular las distancias entre grupos (Lance & Williams, 1967). Para cada par de conglomerados, se calcula la suma de las desviaciones al cuadrado entre cada accesión y el centro del nuevo conglomerado (suma de los cuadrados del error) y se fusiona el par de conglomerados que produce la suma de los cuadrados con el error más bajo. En otras palabras, en cada paso en el proceso de agrupamiento se considera el efecto de la unión de cada posible par de agrupamientos, y se unen los dos conglomerados que producen el menor incremento en la suma de cuadrados del error. Cabe señalar que tanto UPGMA como Ward utilizan la fórmula de recurrencia de Lance y William (Lance & Williams, 1967) para operar directamente sobre cualquier matriz de distancia.

2.8 LITERATURA CITADA

- Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), Article e08093. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021021964>
- Armitage, A. M. (1993). *Specialty cut flowers*. The production of annuals, perennials, bulbs and woody plants for fresh and dried cut flowers. Varsity Press/Timber Press.
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria), (2008). La Floricultura. Dirección Regional Peninsular. *Boletín ASERCA*. (17), 26. <http://www.aserca.gob.mx/artman/uploads/boletin>.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomy Mesoamerican*, 17(2), 221-242. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43717210.pdf>
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I., y Di Rienzo, J. (2010). Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en *Info-Gen*. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina.
- Castroviejo, S. (2020). Flora ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. *Flora ibérica*, (1), 784.
- Chahin, G., Saez, C., & Besoain, X. (2000). Producción comercial de calas y peonías. Centro Regional de Investigación Carillanca. Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. *INIA* 38(1),5. <https://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/20.500.13082/32163>
- Claros, M. G. (1998). Marcadores moleculares: qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Encuentros en la Biología 49. Universidad de Málaga. <https://www.uma.es/estudios/centros/Ciencias/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1), 169-196.

- Cruz, J. G., & Hernández-Montes, A. (2022). Cala 'Sublime', una nueva variedad de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*): Nueva opción florícola. *Agro-Divulgación*, 2(4).
- Cruz-Castillo, J. G., & Torres-Lima, P. A. (2017). 'Deja Vu' un nuevo cultivar de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica*). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 23(2), 97-102.
- Cruz-Castillo, J. G., Mendoza-Ramírez, J., & Torres-Lima, P. A. (2001). Shade, fertilizers and a natural bioregulator to improve *Zantedeschia* growth in a Mexican tropical upland area. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, 85(3/4), 135-142.
- Cruz-Castillo, J. G.; Torres, L. P.; Albores, G. M.; & González, M. L. 2008. Lombricompostas y apertura de la espata en postcosecha del alcatraz "Green Goddess" (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) en condiciones tropicales. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(2), 207-212.
- D'hoop, B. B., Paulo, M. J., Kowitwanich, K., Sengers, M., Visser, R. G., van Eck, H. J., & van Eeuwijk, F. A. (2010). Population structure and linkage disequilibrium unraveled in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(6), 1151-1170.
- DEPI (Department of Environment and Primary Industries), (2012). Invasiveness Assessment – White arum lily (*Zantedeschia aethiopica*) in Victoria. Consultado en junio 2022 en http://vro.depi.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/impact_white_arum_lily
- Duarte, J. M., Santos, J. B. & Melo, L. C. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, 22(3), 427–432. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300024>
- Ferreira, M. E., y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. EMBRAPA-CENARGEN. <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064700.pdf>

- Ganino, T., Bartolini, G., & Fabbri, A. (2006). The classification of olive germplasm. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(3), 319-334.
- González, J.A., García-Peña, H. y Cabo, J.M., (2003) “La flora silvestre de Melilla” (Ciudad Autónoma de Melilla, Consejería de Medio Ambiente, Eds.). Endesa-REMESA.
https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/8a/de/5d/75/8ade5d75-d3e3-4e7c-aed4-cf598789c153/files/Gonzalez_flora-silvestre-de-melilla_2003.pdf
- He S, Yang Y, Li Z, Wang X, Guo Y, Wu H. Comparative analysis of four *Zantedeschia* chloroplast genomes: expansion and contraction of the IR region, phylogenetic analyses and SSR genetic diversity assessment. *PeerJ Life & Environment*, 8, Article e9132.
<https://doi.org/10.7717/peerj.9132>
- Hernández, H. E. (2013). Guía básica del cultivo de alcatraz (*Zantedeschia* sp.) y nociones para su propagación. Facultad de Ciencias Agrícolas. [Experiencia Recepcional, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz].
<https://docplayer.es/18581474-Universidad-veracruzana-guia-basica-del-cultivo-de-alcatraz-zantedeschia-sp-y-nociones-para-su-propagacion.html>
- Jacobs, F. (1993). Calla en maceta y Calla para flor cortada. Dos nuevas posibilidades para el mercado español. *Horticultura. Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola*, (88),38-40.
- Kessel, A. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*, 29(3), 27-37.
- Khattree, R., & Naik, D. N. (2000). *Multivariate Data Reduction and Discrimination with SAS Software*. SAS Publishing. Cary, N.C., U.S.A.
- Kordrostami, M., & Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: concepts and applications. *Genetics in the Third Millennium*, 13, 4024-4031.
- Lance, G. N., & Williams, W. T. (1967). A general theory of classificatory sorting strategies: 1. Hierarchical systems. *The Computer Journal*, 9(4), 373-380.

- Leszczyńska, B. H., y Borys, M. W. (2002). La Flora en la cultura del estado de Puebla. (Siza-CONACYT, UPAEP, Fundación Produce Puebla, Eds.).
- Letty, C. (1973). The genus *Zantedeschia*. *Bothalia*, 11(1/2), 5-26.
- Lincoln, M., Sunil, K. V., Saugato, S., & Jawaharlal, K. (2018). Potential applications of molecular markers in plant. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 12(4), 85-87. <https://juniperpublishers.com/ctbeb/pdf/CTBEB.MS.ID.555844.pdf>
- Macias-Esquivel, M. (2017) *Comportamiento fenológico de alcatraz (Zantedeschia rehmannii Engl.) en maceta como respuesta al vermicompost en el sustrato* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro]. Repositorio del Campus de la UAAAN. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42368/MA.%20DEL%20CONSUELO%20MACIAS%20ESQUIVEL.pdf?sequence=1>
- Marshall B., Harrison R.E., Graham J., McNicol J.W., Wright G. & Squire G.R. (2001). Spatial trends of phenotypic diversity between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus*. *New Phytologist* 151(3), 671-682.
- Milligan, G. W., & Cooper, M. C. (1985). An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. *Psychometrika*, 50(2), 159-179.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. others (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263-273. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Munive, M. G. R., González, A. G., & Dugua, X. A. (2014). ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas (ISSR). En Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A., & Rocha, M. M. G. (Eds.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos* (1ª ed., págs. 101-125). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Autónoma Metropolitana-

Iztapalapa (UAM-I).
[https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M. & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- Padmakar, B., Sailaja, D., & Aswath, C. (2015). Molecular exploration of guava (*Psidium guajava* L.) genome using SSR and RAPD markers: a step towards establishing linkage map. *Journal of Horticultural Sciences*, 10(2), 130-135.
- Paredes D. E. (2006). *Composta de residuos de jardinería en la producción de cala (Zantedeschia albomaculata y Zantedeschia elliotiana)* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo]. Repositorio del Campus UACH.
- Patterson, N., Price, A. L., & Reich, D. (2006). Population structure and eigen analysis. *PLoS Genetics*, 2(12), Article e190. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>
- Peeters, J. P., & Martinelli, J. A. (1989). Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 78(1), 42-48.
- Phillips, W., Fritz, P., & Rodríguez, H. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones de cacao, *Theobroma cacao*. (Informe técnico No. 252). CATIE, Turrialba (Costa Rica). <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/3017>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Reddy, B. V., Reddy, C. C. M., Sekhar, A. C., Reddy, P. C. O., Rajasekhar, P., & Srinivasulu, K. (2021). Role of molecular based markers methods and their applications in crop improvement. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(23-24),38-54.

- <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85104247223&origin=inward&txGid=016d8852f1b565e5df173c5fddce7dd4>
- Reeves, P. A., & Richards, C. M. (2009). Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. *PLoS One*, *4*(1), Article e4269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004269>
- Rodríguez, R. C. M., Rodríguez, B. G. C., López, L. R. Q., & Rodríguez, M. J. M. (2019). Análisis morfológico y molecular de especies de bambú del género *Guadua* (Poaceae: *Bambusoideae*) procedentes de las regiones San Martín y Cajamarca, Perú. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, *3*(1), 83-91.
- Rossi, R., Leolini, C., Costafreda-Aumedes, S., Leolini, L., Bindi, M., Zaldei, A., & Moriondo, M. (2020). Performances evaluation of a low-cost platform for high-resolution plant phenotyping. *Sensors*, *20*(11), 3150.
- Salinger P. J. (1991). *Producción Comercial de Flores* (1ª ed.). Editorial Acribia. https://www.editorialacribia.com/libro/produccion-comercial-de-flores_53879/
- Sánchez de L. V. J. M. (2001). *Guía de las plantas ornamentales*. Editoriales Mundi-prensa.
- Sarwat, M., Srivastava, S., & Khan, T. H. (2016). RAPD and ISSR Polymorphism in the Medicinal Plants: *Ocimum sanctum*, *O. basilicum* and *O. gratissimum*. *IJPPR*, *8*(8), 1417-1424.
- SEFIPLAN (Secretaría de Finanzas y Planeación), (2011). Cuadernillos Municipales, Orizaba. Sistema de Información Municipal. Gobierno del estado de Veracruz.
- Selvakumari, E., Jenifer, J., Priyadharshini, S., & Vinodhini, R. (2017). Application of DNA fingerprinting for plant identification. *JAIR*, *5*(10), 149-151.
- Sharafi, A. A., Sharafi, A., & Abkenar, A. A. (2017). Molecular genetic diversity assessment of Citrus species grown in Iran revealed by SSR, ISSR and CAPS molecular markers. *Journal of Science and Research*, *2*(8), 22-27.

- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera),(2020). Consultado en septiembre, 2022. www.siap.gob.
- Sion, S., Savoia, M. A., Gadaleta, S., Piarulli, L., Mascio, I., Fanelli, V. & Miazzi, M. M. (2021). How to choose a good marker to analyze the olive germplasm (*Olea europaea* L.) and derived products. *Genes*, 12(10), 1474.
- Slaughter, R. J., Beasley, D. M., Lambie, B. S., Wilkins, G. T., & Schep, L. J. (2012). Poisonous plants in New Zealand: a review of those that are most commonly enquired about to the National Poisons Centre. *Journal of the New Zealand Medical Association*, 125(1367), 87-118.
- Snijder R. C. & J. M. V Tuyl. (2002). Breeding for resistance in *Zantedeschia* spp. (Aracea) against soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *Corotovora*. *Acta Horticulturae*, 570,236-266.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.570.33>
- Sokal, R. R. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38(22),1409-1438.
https://ia800703.us.archive.org/5/items/cbarchive_33927_astatisticalmethodforevaluatin1902/astatisticalmethodforevaluatin1902.pdf
- Talavera, S., & Castroviejo, S. (Eds.). (2008). *Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Cyperaceae-Pontederiaceae. *CSIC*. 13(1), 309-310. Disponible en: <https://bibdigital.rjb.csic.es/viewer/12958/?offset=#page=359&viewer=picture&o=bookmark&n=0&q=>
- Tenorio, P. (2014). Método de evaluación rápida de invasividad (MERI) para especies exóticas en México (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/MenuPrincipal/07Fichas%20tecnicas_OK/02Fichas%20tecnicas/Fichas%20t%C3%A9cnicas%20CONABIO_especies%20ex%C3%B3ticas/Fichas%20plantas%20invasoras/R_Z/Zantedeschia%20aethiopica.pdf

- Thakur, J., Dwivedi, M. D., Sourabh, P., Uniyal, P. L., & Pandey, A. K. (2016). Genetic homogeneity revealed using SCoT, ISSR and RAPD markers in micro propagated *Pittosporum eriocarpum* Royle-an endemic and endangered medicinal plant. *PLoS ONE*, 11(7), Article e0159050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159050>
- Torres-Flores, N. I. (2013). *Nutrición nitrogenada y potásica en dos especies de alcatraz (Zantedeschia albomaculata y Z. elliotiana)* [Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados]. Repositorio del Campus CP http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2169/Torres_Flores_NI_MC_Edafologia_2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Trejo-Téllez, B. I., Torres-Flores, N. I., & Trejo-Téllez, L. I. (2014). Caracterización de los productores de alcatraz blanco en La Perla, Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (9) 1795-1801. <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263137781022.pdf>
- UAM (Universidad Autónoma Metropolitana), (2016). Obtiene la UAM la primera variedad de alcatraz generada en México (Boletín No. 444), Boletines UAM. <https://www.comunicacionsocial.uam.mx/boletinesuam/444-16.html>
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). (2001). *Directrices para la Realización de Pruebas de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad: Cala (Zantedeschia Spreng.)*. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales; Ginebra, Suiza: 1985.
- Valadez-Moctezuma, E. y Kahl, G. 2005. *Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y protocolos de laboratorio (5ª ed.)*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Velasco, M. R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Universidad del Cauca, Colombia, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 3(1),14-18. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/619/256>
- Vibrans, H., (2009). *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng. Malezas de México. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

(CONABIO).

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/araceae/zantedeschia-aethiopica/fichas/ficha.htm>

- Villegas Tapia, J. L. (2021). *El cultivo de alcatraz (Zantedeschia aethiopica (L.) Spreng)* [Tesina de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio institucional de la UAEM. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/111405>
- Wang, W., Barratt, B. J., Clayton, D. G., & Todd, J. A. (2005). Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 109-118.
- Ward Jr, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236-244.
- 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>
- Wright, P. J., & Burge, G. K. (2000). Irrigation, sawdust mulch, and Enhance® biocide affects soft rot incidence, and flower and tuber production of calla. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 225-231.
- Yadav, A., Kothari, S. L., Kachwaha, S., & Joshi, A. (2019). In vitro propagation of chia (*Salvia hispanica* L.) and assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and intersimple sequence repeat molecular markers. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(1), 4-7.
- Zamorano V. S., 2009. *Producción de calas (Zantedeschia spp.)*, Universidad de Chile, Facultad de ciencias agronómicas. https://issuu.com/sefotec/docs/produccion_de_calas_de_colores/1

3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE 47 ACCESIONES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng)

3.1 RESUMEN

La obtención de información sobre caracterización, relación entre genotipos y diversidad genética de alcatraz (*Z. aethiopica*) es importante en la conservación del reservorio genético para su uso en programas de mejoramiento genético y utilización de los recursos genéticos de la especie. La caracterización morfológica apoya la selección de caracteres de interés comercial o de rasgos morfológicos estéticos para mejorar su presentación en el mercado. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar *in situ* 47 accesiones de alcatraz cultivadas en los estados de Veracruz y México con ayuda de la guía descriptiva UPOV 2001, a través de 19 caracteres cuantitativos y 20 cualitativos en escala nominal. Mediante el análisis de componentes principales (PCA), se determinó que los primeros cinco componentes de rasgos cuantitativos explicaron el 79.46 % de la variación observada mientras que para los caracteres cualitativos los primeros cinco componentes explicaron el 78.52 % de la variación observada. Los valores propios indicaron que los caracteres relacionados con longitud y anchura del limbo, altura y longitud de la espata, longitud del peciolo y altura de la planta, contribuyeron en gran medida a la diversidad total del germoplasma caracterizado. Mientras que los caracteres cualitativos relacionados con el color de la espata, espádice y tallos fueron los que contribuyeron en mayor medida. Los marcadores morfológicos detectaron diversidad genética entre UBCs y fueron capaces de diferenciar las accesiones mediante un análisis de agrupamiento representado en un dendrograma. Las accesiones se agruparon en cinco y siete grupos o patrones poblacionales, según los rasgos cuantitativos y cualitativos, diferenciadas principalmente por las condiciones climáticas en las cuales prosperan. Las accesiones de *Z. aethiopica* (L.) Spreng, originarias del centro-oriente de Veracruz y Edo. de México analizadas en este estudio presentaron alta variabilidad morfológica, lo cual muestra el potencial de germoplasma y un inicio para establecer estrategias de un programa de mejoramiento genético.

Palabras clave: Alcatraz, caracterización, rasgos morfológicos, multivariado, conglomerados.

3.2 ABSTRACT

Obtaining information on characterization, relationship between genotypes and genetic diversity of calla lily (*Z. aethiopica*) is important in the conservation of the genetic reservoir for use in genetic improvement programs and utilization of the genetic resources of the species. Morphological characterization supports the selection of characters of commercial interest or aesthetic morphological traits to improve market presentation. The objective of the present work was to characterize *in situ* 47 calla lily accessions grown in the states of Veracruz and Mexico with the help of the UPOV 2001 descriptive guide, through 19 quantitative and 20 qualitative characters on a nominal scale. By means of principal component analysis (PCA), it was determined that the first five components of quantitative traits explained 79.46 % of the observed variation while for qualitative traits the first five components explained 78.52 % of the observed variation. The eigenvalues indicated that characters related to blade length and width, spathe height and length, petiole length and plant height contributed largely to the total diversity of the characterized germplasm. While qualitative characters related to spathe color, spadix and stems were the major contributors. Morphological markers detected genetic diversity among UBCs and were able to differentiate accessions by a clustering analysis represented in a dendrogram. The accessions were grouped into five and seven clusters or population patterns, according to quantitative and qualitative traits, differentiated mainly by the climatic conditions in which they thrive. The accessions of *Z. aethiopica* (L.) Spreng, originating from central-eastern Veracruz and Edo. de México analyzed in this study showed high morphological variability, which shows the germplasm potential and a beginning to establish strategies for a genetic improvement program.

Key words: Calla lilly, characterization, morphological traits, multivariate, clustering.

3.3 INTRODUCCIÓN

Zantedeschia, comúnmente conocida como alcatraz, cartucho o cala, es una de las plantas ornamentales más emblemáticas del mundo. En la familia Araceae, el género *Zantedeschia* contiene ocho especies de plantas herbáceas, perennes y con flores que son autóctonas del sur de África, desde Malawi hasta Sudáfrica (Funnell et al., 2006). Es un género de la familia Araceae, con ocho especies en dos secciones: sección *Zantedeschia* con dos especies blancas (*Z. aethiopica* Spreng. y *Z. odorata* Perry.) que florecen a fines del invierno/primavera, con preferencia a las zonas pantanosas de temperaturas más cálidas hábitats y sección *Aestivae* con seis especies de calas que florecen en el verano, en su mayoría de colores, que habitan en ambientes montañosos de temperatura fría y presentan senescencia invernal completa (*Z. albomaculata* Baill., *Z. elliotiana* Engl., *Z. jucunda* Letty., *Z. pentlandii* Wittm., *Z. rehmannii* Engl. y *Z. valida* Singh) (Wei et al., 2017).

Las diferencias morfológicas y bioquímicas resultan de las distintas presiones ecológicas, tanto bióticas como abióticas, en el hábitat natural de cada grupo de *Zantedeschia*. (Davidsson et al., 2013). Cada planta en la naturaleza debe tener rasgos morfológicos y anatómicos únicos. Las plantas pertenecientes a un mismo género presentarán variaciones morfológicas y anatómicas, así como distintas edades, o más concretamente, cuando aún no están maduras. Este fenómeno ocurre como resultado del crecimiento y desarrollo imperfecto integral de las estructuras morfológicas y anatómicas de las plantas jóvenes. La identificación de rasgos morfológicos y anatómicos también podría ser un intento de determinar a qué género deberían pertenecer las plantas (Sarjani et al., 2017).

La evaluación de la diversidad genética es un componente esencial de la caracterización y conservación del germoplasma para identificar padres potenciales para un programa de mejoramiento (Friedt et al., 2007). Por lo tanto, es crucial aclarar las relaciones genéticas y la estructura de la población entre los germoplasmas de alcatraces.

La caracterización de diferentes rasgos morfológicos es el primer paso para describir y clasificar germoplasmas de varios cultivos (Balduzzi et al., 2017). Para elegir los progenitores y sus progenies, es necesario un documento de características morfológicas para caracterizar y categorizar los germoplasmas. Comprender la variabilidad fenotípica proporcionada por varias características morfológicas y agronómicas, es crucial para la conservación, las estrategias de mejoramiento, el desarrollo y la comercialización de nuevas variedades (Gonçalves et al., 2008). La elección de características morfológicas apropiadas también es necesaria para conservar y utilizar los recursos genéticos (Giraldo et al., 2010).

Los enfoques de análisis multivariado pueden ayudar a determinar la diversidad genética y clasificar los germoplasmas (Uyeda et al., 2015). Entre estas técnicas, el análisis de componentes principales (PCA) es un enfoque estadístico para categorizar muchas variables en variables primarias no correlacionadas. El PCA se puede emplear para identificar las características del germoplasma, visualizar las diferencias y relaciones de los individuos y evaluar su contribución a la variación total (Martínez et al., 2008; Singh et al., 2016). Además, el análisis de conglomerados jerárquicos se puede utilizar para categorizar y organizar el germoplasma (Aghaei et al., 2008; Karimi et al., 2009)

Es de gran importancia caracterizar para la domesticación y recolección de los genotipos élite y promisorios de especies ornamentales con potencial de alto impacto social-económico. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar las accesiones de alcatraz en función de sus características morfológicas cualitativas y cuantitativas utilizando herramientas de análisis multivariadas e identificar germoplasmas divergentes y superiores.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Caracterización de material vegetal

Se caracterizaron 47 accesiones *in situ* de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng), en los estados de Veracruz y Edo. de México (Cuadro 3). Los materiales caracterizados se agruparon en 4 áreas ecológicas (Cuadro 4). La población A abarca 5 individuos silvestres caracterizados en el municipio de La Perla; la población B incluye 16 individuos caracterizados en la localidad de Tuzantla, en La Perla, Veracruz. La población C corresponde a 22 individuos caracterizados en el municipio de Huatusco en la localidad de Elotepec, Veracruz y la población D comprende 4 individuos silvestres del sitio Chapingo, del municipio de Texcoco, Estado de México.

Cuadro 3. Ubicación geográfica de los genotipos de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng).

UBC	Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas					
				Latitud (N)			Longitud (O)		
				°	'	"	°	'	"
C1	La perla	La perla	Veracruz	18	56	11.7	97	08	05.2
C2	La perla	La perla	Veracruz	18	56	12.2	97	08	04.3
C3	La perla	La perla	Veracruz	18	56	12.3	97	08	04.2
C4	La perla	La perla	Veracruz	18	56	12.3	97	08	04.2
C5	La perla	La perla	Veracruz	18	56	12.0	97	08	04.8
C6	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	19.1	97	09	21.1
C7	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	22.1	97	09	26.4
C8	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	27.2	97	09	32.7
C9	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	27.5	97	09	32.5
C10	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	32.2	97	09	35.8
C11	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	38.3	97	09	36.8
C12	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	38.8	97	09	33.1
C13	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	38.6	97	09	31.9

UBC	Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas					
				Latitud (N)			Longitud (O)		
				°	'	"	°	'	"
C14	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	38.3	97	09	32.3
C15	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.7	97	09	32.9
C16	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.6	97	09	33.0
C17	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.4	97	09	33.4
C18	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.2	97	09	33.5
C19	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.3	97	09	33.4
C20	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.3	97	09	33.4
C21	Tuzantla	La perla	Veracruz	18	57	37.4	97	09	32.6
C22	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.9	97	02	14.7
C23	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.2	97	02	15.8
C24	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.2	97	02	15.6
C25	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.3	97	02	15.2
C26	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.0	97	02	14.6
C27	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.5	97	02	14.2
C28	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.9	97	02	14.2
C29	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.8	97	02	14.2
C30	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.9	97	02	14.5
C31	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.4	97	02	15.0
C32	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.4	97	02	14.9
C33	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.2	97	02	15.5
C34	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.1	97	02	14.4
C35	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.2	97	02	15.5
C36	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.9	97	02	14.5
C37	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.1	97	02	15.2
C38	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.1	97	02	15.2
C39	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.0	97	02	14.5
C40	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.2	97	02	15.0
C41	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	14.9	97	02	14.5
C42	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.0	97	02	15.4
C43	Elotepec	Huatusco	Veracruz	19	11	15.0	97	02	14.2
C44	Chapingo	Texcoco Mora	de Edo. de México	19	29	31.6	98	53	19.6

UBC	Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas								
				Latitud (N)			Longitud (O)					
				°	'	"	°	'	"			
C45	Chapingo	Texcoco Mora	de Edo. México	de	19	29	31.5	98	53	19.5		
C46	Chapingo	Texcoco Mora	de Edo. México	de	19	29	32.4	98	53	19.1		
C47	Chapingo	Texcoco Mora	de Edo. México	de	19	29	32.4	98	53	19.1		

Cuadro 4. Sitios de caracterización del material vegetal de *Z. aethiopica*.

Población	Localidad	Municipio/Estado	Ubicación geográfica
A	La perla	La perla, Veracruz	LN: 18° 55' LO: 97° 05' Altura: 1779 msnm
B	Tuzantla	La perla, Veracruz	LN: 18° 57' LO: 97° 09' Altura: 2037 msnm
C	Elotepec	Huatusco, Veracruz	LN: 19° 11' LO: 97° 02' Altura: 1860 msnm
D	Chapingo	Texcoco de Mora, Edo. de México.	LN: 19° 29' LO: 98° 53' Altura: 2262 msnm

3.4.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó con base a 40 descriptores establecidos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), para *Zantedeschia* Spreng (Cuadro 5). Dichas directrices de examen se aplican a todas las variedades de multiplicación vegetativa de *Zantedeschia* Spreng, de la familia de las Aráceas. Se tomaron datos de 5 plantas de cada accesión estudiada. Todas las observaciones se efectuaron en plantas con flores de tamaño máximo, en el momento de plena floración. Todas las observaciones de la hoja se efectuaron en hojas totalmente desarrolladas de tallos en floración.

Las valoraciones de la flor se realizaron al comienzo de la dehiscencia de las anteras. Las directrices marcadas por UPOV en el documento TG/177/3 Cala, 2001-04-04, se interpretarán en conjunto con las Directrices marcadas en el documento TG/1/3, el cual contiene notas explicativas sobre los principios generales utilizados para el establecimiento de dichas directrices.

Cuadro 5. Caracteres morfológicos evaluados *in situ* en 47 accesiones de *Z. aethiopica*

Carácter	Escala	Clave
1. Planta: tipo	1=caducifolia, 2=semicaducifolia, 3=de hoja perenne	CL1
2. Planta: altura	3=baja, 5=media, 7=alta	CT2
3. Variedades caducifolias únicamente: planta: número total de tallos	3=bajo, 5=medio, 7=alto	CT3
4. Tallo joven: color	1=verde amarillento, 2=verde, 3=rojo púrpura	CL4
5. Pecíolo: longitud	3=corta, 5=media, 7=larga	CT5
6. Pecíolo: color de la parte inferior	1=verde 2=amarillento, 3=verde claro, 4=verde medio, 5=Verde oscuro, 6=marrón rojizo púrpura	CL6
7. Limbo: porte	1=erecto, 2=semierecto, 3=horizontal	CL7
8. Limbo: longitud (excluido los lóbulos)	1=muy corto, 3=corto, 5=medio 7=largo, 9=muy largo	CT8
9. Limbo: anchura	1=estrecho, 3=estrecho a medio, 5=medio, 7=medio a ancho, 9=ancho	CT9
10. Limbo: posición de la parte más ancha	1=en la mitad, 2=ligeramente por debajo de la mitad, 3=claramente por debajo de la mitad	CL10
11. Limbo: lóbulos	1=ausentes, 9=presentes	CL11
12. Limbo: longitud del lóbulo	3=corto, 5=medio, 7=largo	CT12
13. Limbo: forma del ápice (excluida la punta caudada)	1=aguda, 2=en ángulo recto 3=obtusa	CL13
14. Limbo: intensidad del color verde del haz	3=clara, 5=media, 7=oscura	CT14
15. Limbo: manchas en el haz	1=ausentes, 9=presentes	CL15
16. Limbo: tamaño de las manchas en el haz	3=pequeño, 5=Medio, 7=grande	CT16
17. Limbo: número de manchas en el haz	1=muy bajo, 3=bajo, 5=medio 7=alto, 9=muy alto	CT17
18. Limbo: ondulación del borde	1=ausente o expresada muy débilmente, 2=expresada débilmente, 3=expresada fuertemente	CL18
19. Escapo: grosor	3=delgado, 5=medio, 7=grueso	CT19

Carácter	Escala	Clave
20. Escapo: coloración roja	1=ausente o muy débil, 3= débil 5= media, 7= fuerte, 9=muy fuerte	CT20
21. Escapo: jaspeado de la parte basal	1=ausente o expresado muy débilmente, 2=expresado débilmente, 3=expresado fuertemente	CL21
22. Espata: altura	1=baja, 3=baja a media, 5=media, 7=media a alta, 9=alta	CT22
23. Espata: longitud (vista desde arriba)	1=corta, 3=corta a media 5=media, 7=media a larga, 9=larga	CT23
24. Espata: anchura vista desde arriba	1=estrecha, 3=estrecha a media 5=media, 7=media a ancha 9=ancha	CT24
25. Espata: altura de la parte superpuesta	3=baja, 5=media, 7=alta	CT25
26. Espata: forma natural de la parte distal (excluida la punta caudada)	1=aguda, 2=obtusa, 3=redondeada	CL26
27. Espata: color principal de la cara interna (excluido el color de la mancha de la garganta, de estar presente)	Carta de colores RHS	CL27
28. Espata: color secundario de la cara interna (excluido el color de la mancha de la garganta)	1=verde oscuro, 2=naranja rojizo, 3=rojo, 4=rosa anaranjado, 5=rosa, 6=rosa rojizo, 7=rosa púrpura, 8=rosa azulado, 9=púrpura rojizo, 10=púrpura rojizo oscuro	CL28
29. Espata: cambio gradual de color de la base al ápice (cara interna, excluidas las variedades con mancha en la garganta)	1=fuertemente atenuado, 2=débilmente atenuado, 3=sin cambios o cambios muy leves, 4=intensificándose débilmente 5=intensificándose fuertemente	CL29
30. Espata: tamaño de la zona de color inalterado de la base (como para 29)	3=pequeño, 5=medio, 7=grande	CT30
31. Espata: presencia de mancha en la garganta	1=ausente, 9=presente	CL31
32. Espata: tamaño de la mancha de la garganta	3=pequeño, 5=mediano, 7=grande	CT32
33. Espata: color de la mancha de la garganta	1=rosa, 2=púrpura	CL33
34. Espata: color principal de la cara externa	1=blanco, 2=blanco verdoso, 3=amarillo claro, 4=amarillo medio, 5=naranja amarillento, 6=naranja rojizo, 7=rojo amarillento, 8=rosa rojizo, 9=rosa púrpura, 10=púrpura rojizo, 11=púrpura marrón, 12=púrpura	CL34
35. Espata: curvatura del borde	3=débil, 5=Media, 7=fuerte	CT35

Carácter	Escala	Clave
36. Espádice: longitud	3=corto, 5=medio, 7=largo	CT36
37. Espádice: anchura del medio de la parte masculina	3=estrecha, 5=media, 7=ancha	CT37
38. Espádice: color principal justo antes de la emisión del polen	1=blanco, 2=verde amarillento, 3=amarillo claro, 4=amarillo medio, 5=naranja amarillento, 6=marrón anaranjado, 7=rojo anaranjado, 8=rosa, 9=rojo púrpura, 10=púrpura	CL38
39. Grado de decoloración de la flor con el tiempo	1=ausente o expresado muy débilmente, 2=expresado débilmente, 3=expresado fuertemente	CL39
40. Cambio de color con el tiempo	1=fuertemente atenuado, 2=débilmente atenuado, 3=sin cambios o cambios muy leves, 4=intensificándose débilmente, 5=intensificándose fuertemente	CL40

3.4.3 Genotipos empleados

Colectas. Se obtuvieron 26 colectas procedentes de los estados de Veracruz y Edo de México, consideradas como UBCs (Unidades Básicas de Caracterización) (Cuadro 6), las cuales mostraban variabilidad fenotípica con respecto a caracteres como altura de planta, tamaños y formas de hojas y espatas. La tonalidad de espatas dominante en las colectas fue el color blanco o “criollo” el alcatraz más común en México (Figura 2) (UAM, 2016).

Cuadro 6. Genotipos de *Z. aethiopica* manejados en la caracterización molecular con marcadores ISSR.

UBC	Localidad	Estado	Cultivar	Color de Espata	Genotipo
C1	La perla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C2	La perla	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C3	La perla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C4	La perla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C5	La perla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C6	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta

UBC	Localidad	Estado	Cultivar	Color de Espata	Genotipo
C7	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C8	Tuzantla	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C9	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C10	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C11	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C12	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C13	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C14	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C15	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C16	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C17	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C18	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C19	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C20	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C21	Tuzantla	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C22	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C23	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C24	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C25	Elotepec	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C26	Elotepec	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C27	Elotepec	Veracruz	Utopía	Blanco y lila	Híbrido
C28	Elotepec	Veracruz	Deja Vu	Blanco, rosado y verde	Híbrido
C29	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C30	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C31	Elotepec	Veracruz	Hércules	Blanco	Líneas
C32	Elotepec	Veracruz	Criollo	Blanco	Colecta
C33	Elotepec	Veracruz	Hércules	Blanco	Líneas
C34	Elotepec	Veracruz	Sublime	Blanco línea purpura	Híbrido
C35	Elotepec	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C36	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C37	Elotepec	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C38	Elotepec	Veracruz	Criollo	Crema	Colecta
C39	Elotepec	Veracruz	Green Goddess	Verde	Líneas
C40	Elotepec	Veracruz	Selección	Blanco y Morado	Híbrido

UBC	Localidad	Estado	Cultivar	Color de Espata	Genotipo
C41	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C42	Elotepec	Veracruz	Morada	Morada	Híbrido
C43	Elotepec	Veracruz	Pink Mist	Rosa claro	Líneas
C44	Chapingo	Edo. de México	Criollo	Blanco	Colecta
C45	Chapingo	Edo. de México	Criollo	Blanco	Colecta
C46	Chapingo	Edo. de México	Criollo	Blanco	Colecta
C47	Chapingo	Edo. de México	Criollo	Blanco	Colecta

Líneas. Se caracterizaron tres líneas o cultivares: 'Green Goddess', 'Hércules' y seedlings de 'Pink Mist' (Cuadro 7) (Figura 3); entre ellas se seleccionaron 16 UBCs obtenidas en la localidad de Elotepec Municipio de Huatusco, Veracruz (Cuadro 6). Los materiales escogidos presentaron diferencias en tonos, tamaños y formas de espatas u hojas, así como manchas en el haz (hojas maculadas) (Figura 5).

Variedades derivadas. Adicionalmente dentro de este sitio se consideraron las tres primeras variedades o cultivares de alcatraz mexicanas: “Deja Vu” (Cruz & Torres, 2017), “Utopía” y “Sublime” (Cruz & Hernández, 2022) (Cuadro 8) (Figura 4). Del sitio de colecta se seleccionaron 5 UBCs, tres genotipos registrados y 2 genotipos en evaluación obtenidos a partir de las líneas antes citadas provenientes del estado de Veracruz (Cuadro 6).

Cuadro 7. Descripción de líneas utilizadas de alcatraz (*Z. aethiopica*) en la caracterización molecular.

Cultivar	Características
Blanco o Criollo	El alcatraz más común en México es el 'Criollo' de espata blanca, el cual es perenne (Cruz & Torres, 2017).
Green Goddess	Posee rayas verdes en las espatas, su espata es más abierta y ancha y tiene la tendencia a desarrollar franjas curvas en el borde de la espata que la forma blanca original (Cruz et al., 2006).
Hércules	Es un cultivar extremadamente vigoroso que puede alcanzar hasta 1,80 m de altura, tiene hojas muy grandes y espatas blancas (Cruz & Torres, 2017).
Pink Mist	Tiene una base rosada en la espata, es bastante delicada y débil en comparación con la forma blanca (Cruz & Torres, 2017).

Cuadro 8. Descripción de las variedades derivadas, utilizadas de alcatraz (*Z. aethiopica*) en la caracterización molecular.

Cultivar	Características
Deja Vu	Este nuevo cultivar presenta tres colores en su espata: blanco, rosado, verde y sus hojas no son maculadas (Cruz & Torres, 2017).
Utopía	El principal carácter de 'Utopía' es su color rosado-púrpura-blanco en la parte externa de la espata. Asimismo, la espata tiene diferentes colores en las caras externas, un calor rosado-púrpura en una cara, y la otra cara es de color blanco. La cara interna es blanca (Cruz, 2022).
Sublime	El principal carácter de 'Sublime' es su color blanco en casi toda la espata y una ligera línea de color púrpura en su base. La cara interna también es de color blanco. Todas sus hojas son maculadas (Cruz & Hernández, 2022).



Figura 2. Diversidad morfológica de tamaño y forma de flores criollas entre las accesiones evaluadas de alcatraz *Z. aethiopica*:



Figura 3. Líneas de alcatraz *Z. aethiopica*: A): Espata (vista lateral) de "Green Goddess"; B): Espata (vista lateral desde arriba) de "Green Goddess"; C): Espata (vista lateral) de "Hércules"; D): Espata (vista lateral desde arriba) de "Hércules"; E): Espata (vista lateral) de seedlings de "Pink Mist"; F): Espata (vista lateral desde arriba) de seedlings de "Pink Mist".

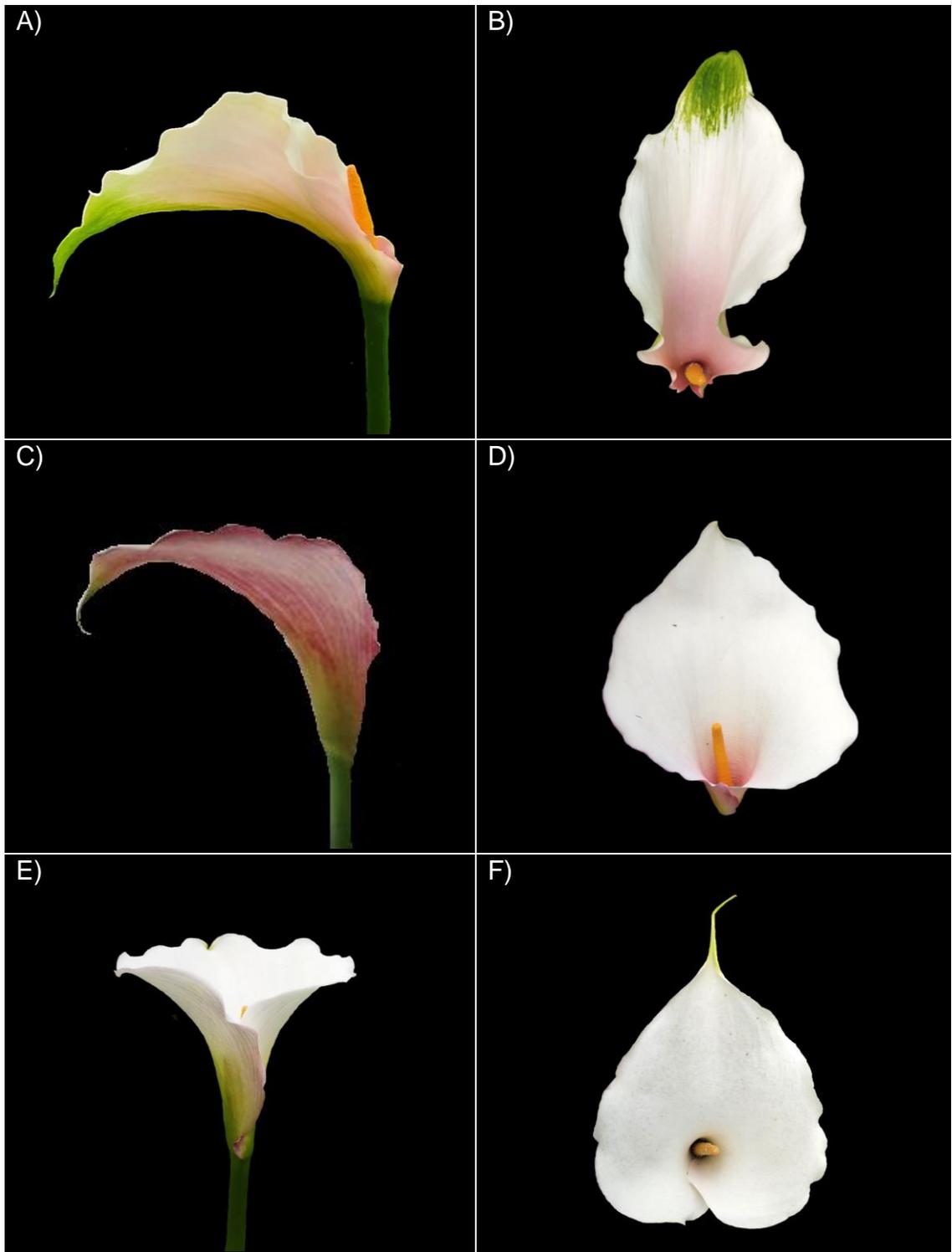


Figura 4. Híbridos de alcatraz *Z. aethiopica*: A: Espata (vista lateral) de “Deja Vu”; B: Espata (vista lateral desde arriba) de “Deja Vu”; C: Espata (vista lateral) de “Utopía”; D: Espata (vista lateral desde arriba) de “Utopía”; E: Espata (vista lateral) de “Sublime”; F: Espata (vista lateral desde arriba) de “Sublime”.

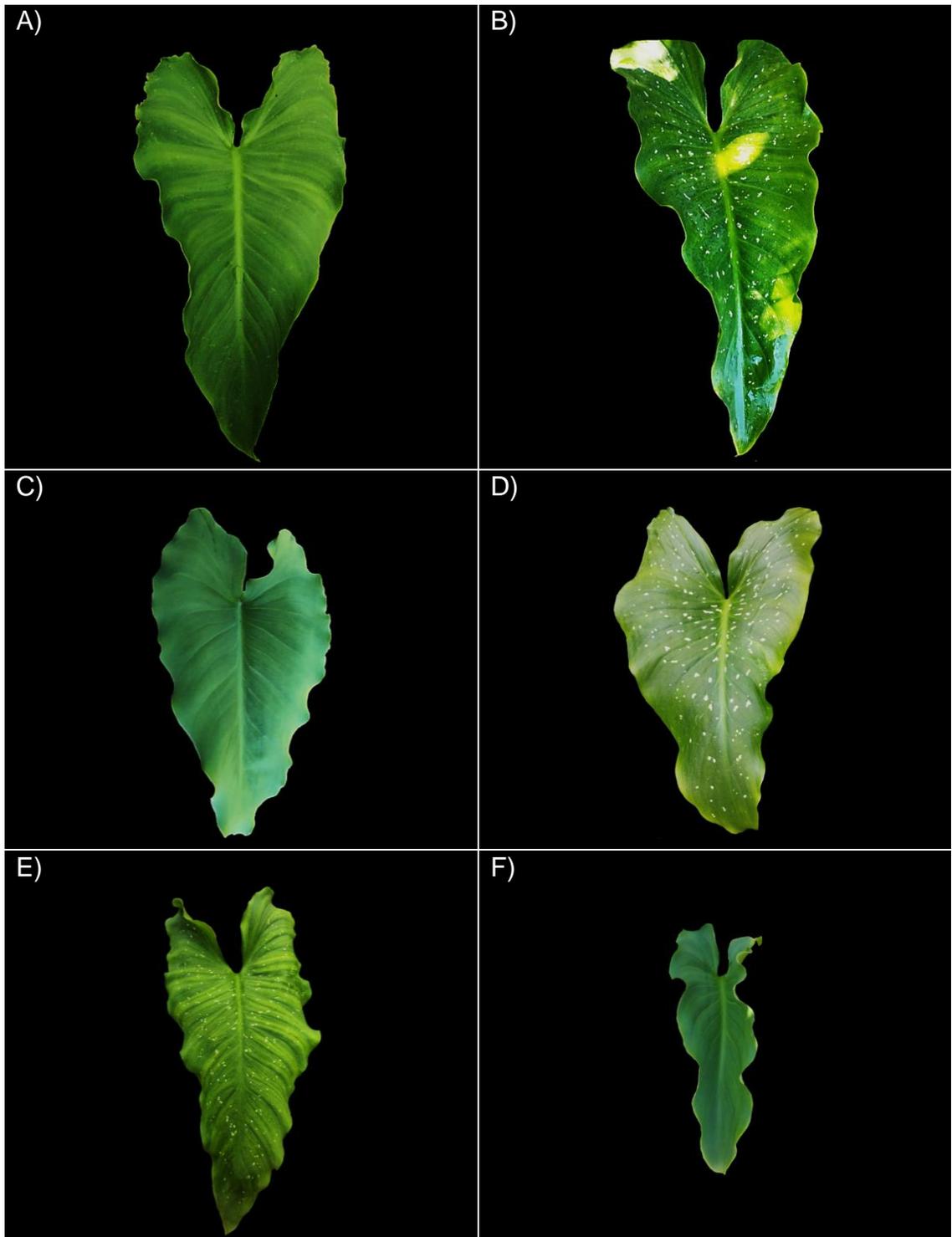


Figura 5. Diversidad morfológica de tamaño, forma, maculaciones y color de las características de las hojas entre las accesiones evaluadas de alcatraz *Z. aethiopica*: A: Limbo (haz) de “Hércules”; B: Limbo maculado (haz) de “Hércules”; C: Limbo (haz) de tipo “Green Goddess”; D: Limbo maculado (haz) de tipo “Green Goddess”; E: Limbo maculado (haz) de “Sublime”; F: Limbo (haz) de “Criollo”.

3.4.4 Análisis de estadístico

Se consideraron 20 caracteres morfológicos cualitativos (CL1, CL4, CL6, CL7, CL10, CL11, CL13, CL15, CL8, CL21, CL26, CL27, CL28, CL29, CL31, CL33, CL34, CL38, CL39, CL40) y 19 cuantitativos (CT2, CT5, CT8, CT9, CT12, CT14, CT16, CT17, CT19, CT20, CT22, CT23, CT24, CT25, CT30, CT32, CT35, CT36, CT37) en escala nominal para evaluar la diversidad, como se presenta en el Cuadro 5.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para identificar grupos y encontrar los atributos que contribuyeron significativamente a la varianza utilizando la matriz de correlación a través del programa SAS/ STAT® versión 9.4. (SAS Institute Inc., 1990). Se crearon diagramas de dispersión bidimensionales utilizando los dos primeros componentes principales, que representaron la mayor variación. para observar la ordenación de las accesiones caracterizadas a través del paquete estadístico InfoStat2020.

Se generaron dendrogramas para variables cualitativas y cuantitativas por separado y datos de ambos tipos de marcadores (datos de variables cuantitativas más cualitativas), así como la obtención del coeficiente de correlación cofenético (r). Se construyó una matriz básica de datos (MBD) para realizar un análisis de conglomerados jerárquicos mediante el enfoque de varianza mínima de Ward como un algoritmo de agrupamiento (Williams, 1976), la medida de disimilitud fue la distancia euclidiana entre grupos; que permitió diferenciar los grupos establecidos (Ward, 1963). La altura de corte se decidió con base en la Pseudo Estadística T^2 (Hotelling, 1951) y la Pseudo F (Johnson, 1998).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Análisis de Componentes Principales

Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) en 47 UBC's de alcatraces utilizando 19 variables morfológicas cuantitativas y 20 cuantitativas para descubrir los distintos factores/componentes que tuvieron un fuerte impacto en los indicadores integrales.

3.5.2 Análisis PCA de caracteres morfológicos cuantitativos

A través del análisis de las variables morfológicas cuantitativas se obtuvieron los valores propios, el porcentaje de contribución a la variabilidad y la tasa de contribución acumulativa de los componentes principales (CP). El análisis PCA reveló que cinco de los diecinueve componentes principales contribuyeron significativamente a casi el 80 % de las variaciones cuantitativas totales. El primer componente (CP1) posee la mayor varianza (44.12 %), seguido de CP2 que representó el 11.38 % mientras que CP3, CP4 y CP5 representaron el 10.93 %, 8.42 % y 4.6 % del total de la variación morfológica cuantitativa, respectivamente (Cuadro 9).

Cuadro 9. Los autovalores, la proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 19 caracteres cuantitativos morfológicos de *Z. aethiopica*.

CP	Eigenvalor	Proporción	Acumulado	Porcentaje
1	8.3836574	0.4412	0.4412	44.12
2	2.1625845	0.1138	0.5551	55.51
3	2.0774390	0.1093	0.6644	66.44
4	1.6005001	0.0842	0.7486	74.86
5	0.8732711	0.0460	0.7946	79.46
6	0.7567413	0.0398	0.8344	83.44
7	0.7214163	0.0380	0.8724	87.24
8	0.5692509	0.0300	0.9024	90.24
9	0.4229431	0.0223	0.9246	92.46
10	0.3182520	0.0168	0.9414	94.14
11	0.2502296	0.0132	0.9545	95.45
12	0.1949253	0.0103	0.9648	96.48

CP	Eigenvalor	Proporción	Acumulado	Porcentaje
13	0.1629446	0.0086	0.9734	97.34
14	0.1426522	0.0075	0.9809	98.09
15	0.1168276	0.0061	0.9870	98.70
16	0.0940525	0.0050	0.9920	99.20
17	0.0822431	0.0043	0.9963	99.63
18	0.0700696	0.0037	1.0000	100.00
19	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00

Los autovalores obtenidos y el valor de los CP han sido construidos a partir de la combinación lineal de las variables transformadas (Cuadro 10). El PCA de las características cuantitativas mostró que las variables que tuvieron mayor peso para la construcción del CP1, fueron: la anchura de limbo (CT9), la longitud de limbo (CT8), la altura de la espata (CT22), la longitud de la espata (CT23), el grosor del escapo (CT19), la altura de la planta (CT2), la anchura de la espata (CT24) y la longitud del peciolo (CT5). Dichas variables contribuyeron positivamente a este componente, lo que sugiere que el CP1 está relacionado principalmente con la hoja, características de la flor y altura de la planta.

Las variables más representativas para la construcción positiva del CP2, fueron: intensidad del color verde del haz del limbo (CT14), tamaño de la mancha de la garganta en la espata (CT32), intensidad de la coloración roja en el escapo (CT20), altura de la parte superpuesta de la espata (CT25), también reveló una carga negativa en el tamaño de las manchas en el haz del limbo (CT16), y el número de manchas en el haz del limbo (CT17), lo que indicó que el CP2 es el factor principal que contribuye a las características de la espata y hojas maculados. Por otra parte, las variables que más contribuyeron de manera positiva para la formación del CP3, fueron: longitud del espádice (CT36), anchura del espádice (CT37), altura de la parte superpuesta de la espata (CT25). Así mismo el CP3 fue construido negativamente por la curvatura del borde en la espata (CT35) y el tamaño de la mancha de la garganta de la espata (CT32) y el tamaño de la zona de color inalterado de la base de la espata (CT30). Por lo tanto, este CP contribuye a características del espádice y la espata.

Los componentes CP4 y CP5 mostraron una fuerte carga positiva por características del escapo y espata, mientras que características relacionadas a la anchura y altura de hojas, espatas y espádices tienen una carga negativa en la construcción de los CPs (Cuadro 10). En general, los componentes CP1 y CP2 constituyen el 55.51% de las variaciones morfológicas cuantitativas totales con rasgos cuantitativos relacionados con características de la hoja, flor y altura de la planta (Figura 6).

Cuadro 10. Autovalores de las variables cuantitativas morfológicas de 47 UBC's de *Z. aethiopica*, para los primeros cinco componentes principales (PC).

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Planta: altura (CT2)	0.285	0.009	0.045	-0.061	0.112
Pecíolo: longitud (CT5)	0.282	0.148	-0.018	-0.226	0.091
Limbo: longitud (CT8)	0.307	0.074	-0.025	0.037	-0.010
Limbo: anchura (CT9)	0.321	0.109	-0.033	0.013	0.028
Limbo: longitud del lóbulo (CT12)	0.276	-0.146	0.012	-0.246	0.095
Limbo: intensidad del color verde del haz (CT14)	0.026	0.351	0.247	-0.358	0.139
Limbo: tamaño de las manchas en el haz (CT16)	0.146	-0.536	0.184	0.194	0.171
Limbo: número de manchas en el haz (CT17)	0.146	-0.536	0.184	0.194	0.171
Escapo: grosor (CT19)	0.288	0.143	0.015	0.136	0.113
Escapo: coloración roja (CT20)	0.058	0.242	-0.182	0.534	0.025
Espata: altura (CT22)	0.304	0.038	0.108	0.036	0.012
Espata: longitud (CT23)	0.298	0.076	-0.082	-0.061	-0.182
Espata: anchura (CT24)	0.283	0.043	-0.004	0.114	-0.271
Espata: altura de la parte superpuesta (CT25)	-0.126	0.211	0.325	0.010	0.704
Espata: tamaño de la zona de color inalterado de la base (CT30)	0.228	-0.127	-0.218	-0.180	0.326
Espata: tamaño de la mancha de la garganta (CT32)	0.069	0.245	-0.241	0.502	0.282
Espata: curvatura del borde (CT35)	0.269	-0.017	-0.262	-0.143	-0.015
Espádice: longitud (CT36)	0.103	0.160	0.521	0.069	-0.142
Espádice: anchura (CT37)	0.138	0.076	0.515	0.217	-0.263

El color rojo y azul indicaron aportes positivos y negativos y su intensidad representa su aporte, a mayor intensidad, mayor aporte en la construcción del CP.

La distribución en los ejes cartesianos de las Unidades Básicas de Caracterización (UBC), así como los variables en la construcción de CP1 y CP2 se muestra en la Figura 6. Dada la distribución obtenida de las variables, observamos que las UBC's pertenecientes a tipo "Green Goddess", "Hércules", "Sublime" y "Selección morada", están relacionados por la presencia de características como; manchas en el haz (número y tamaño de manchas en la hoja), a la longitud del lóbulo en el limbo y al tamaño de la zona de color inalterado de la base en la espata.

Las variedades "Green Goddess", "Hércules", "Deja Vu" y "Utopía" se relacionaron por variables como: anchura y longitud de limbo, altura y longitud de la espata, siendo estas las que presentaron mayores dimensiones. Por el contrario, las dimensiones más pequeñas de estas variables agruparon a cultivares como "Pink Mist", "Selección Morada" y "Criollo". La variable relacionada a la altura de la parte superpuesta de la espata es aquella que agrupó principalmente a cultivares como "Pink Mist" y "Criollas".

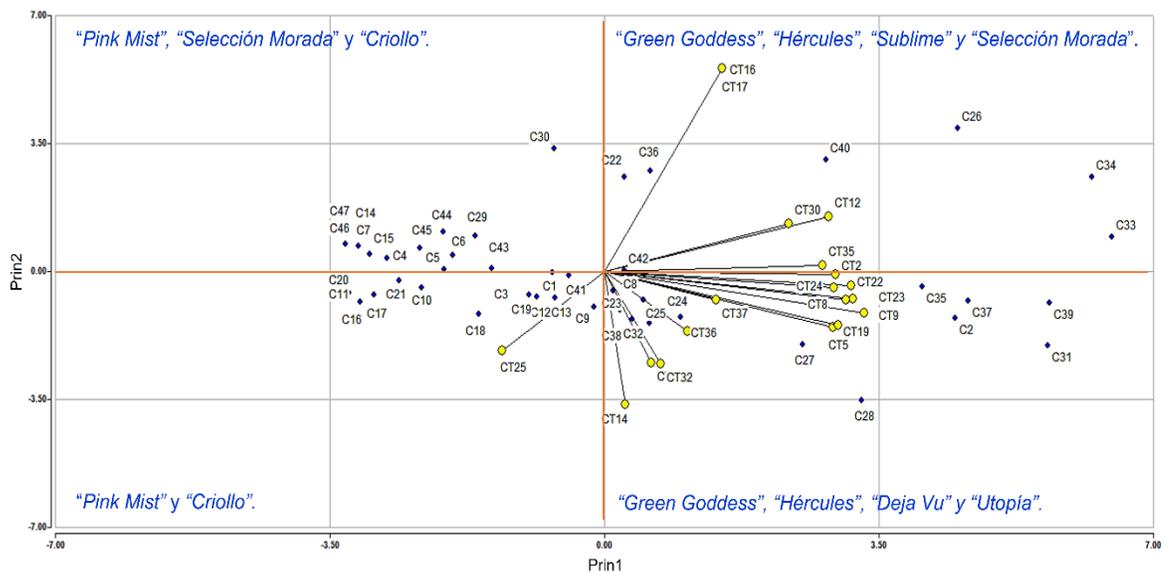


Figura 6. Biplot de 47 accesiones de alcatraz para los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2). Las líneas indican la contribución (magnitud y dirección) de las 19 características morfológicas cuantitativas en los componentes principales CP1 y CP2.

3.5.3 Análisis PCA de los rasgos morfológicos cualitativos

Los valores propios, el porcentaje de contribución a la variabilidad y la tasa de contribución acumulativa de los componentes principales (CP) se muestran en el Cuadro 11. El PCA identificó que cinco componentes principales (CP1, CP2, CP3, CP4 y CP5) contribuyeron significativamente con el 78.52 % de la variación total en los rasgos morfológicos cualitativos. Se describió que el CP1 tenía la varianza más alta con 33.85 %, seguido de CP2, CP3, CP4 y CP5, que representaron el 18.57 %, el 9.83 %, el 8.51 % y el 7.76 % de la variación morfológica cualitativa total, respectivamente.

Cuadro 11. Autovalores y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 20 caracteres cualitativos morfológicos de *Z. aethiopica*.

CP	Eigenvalor	Proporción	Acumulado	Porcentaje
1	5.4163131	0.3385	0.3385	33.85
2	2.9718007	0.1857	0.5243	52.43
3	1.5730119	0.0983	0.6226	62.26
4	1.3610283	0.0851	0.7076	70.76
5	1.2408518	0.0776	0.7852	78.52
6	0.7935007	0.0496	0.8348	83.48
7	0.7094104	0.0443	0.8791	87.91
8	0.5327063	0.0333	0.9124	91.24
9	0.4210482	0.0263	0.9387	93.87
10	0.3662353	0.0229	0.9616	96.16
11	0.2217608	0.0139	0.9755	97.55
12	0.149041	0.0093	0.9848	98.48
13	0.1295127	0.0081	0.9929	99.29
14	0.0893085	0.0056	0.9985	99.85
15	0.0244704	0.0015	1.0000	100.00
16	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00
17	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00
18	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00
19	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00
20	0.0000000	0.0000	1.0000	100.00

Cuadro 12. Autovalores de las variables cualitativas morfológicas de 47 UBC's de *Z. aethiopica*, para los primeros cinco componentes principales (PC).

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Tipo de planta (CL1)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tallo joven: color (CL4)	0.094	-0.289	0.140	0.541	0.233
Pecíolo: color de la parte inferior (CL6)	-0.046	-0.419	0.288	0.034	0.118
Limbo: porte (CL7)	0.005	0.023	0.131	0.385	-0.644
Limbo: posición de la parte más ancha (CL10)	-0.182	0.220	-0.432	-0.186	0.108
Limbo: lóbulos (CL11)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Limbo: forma del ápice (CL13)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Limbo: manchas en el haz (CL15)	0.223	0.018	-0.418	0.041	0.073
Limbo: ondulación del borde (CL18)	-0.088	-0.215	0.462	-0.338	0.207
Escapo: jaspeado de la parte basal (CL21)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Espata: forma natural de la parte distal (CL26)	0.254	-0.161	-0.084	-0.497	-0.161
Espata: color principal de la cara interna (CL27)	0.412	-0.015	-0.007	0.076	0.039
Espata: color secundario de la cara interna (CL28)	0.382	0.120	-0.006	0.098	0.213
Espata: cambio gradual de color de la base al ápice (CL29)	-0.316	0.065	-0.165	0.319	0.331
Espata: presencia de mancha en la garganta (CL31)	-0.028	0.496	0.312	-0.018	0.189
Espata: color de la mancha de la garganta (CL33)	-0.028	0.496	0.312	-0.018	0.189
Espata: color principal de la cara externa (CL34)	0.369	0.149	0.159	0.063	-0.003
Espádice: color principal justo antes de la emisión del polen (CL38)	0.106	-0.278	-0.107	-0.066	0.420
Grado de decoloración de la flor con el tiempo (CL39)	0.367	0.086	-0.142	0.152	0.143
Cambio de color con el tiempo (CL40)	0.367	0.048	0.139	-0.106	-0.080

El color rojo y azul indicaron aportes positivos y negativos y su intensidad representa su aporte, a mayor intensidad, mayor aporte en la construcción del CP.

El PCA (Cuadro 12) y biplot (Figura 7) de rasgos cualitativos mostraron que el color principal de la cara interna de la espata (CL27), el color secundario de la cara interna de la espata (CL28), el color principal de la cara externa de la espata (CL34), el grado de decoloración de la flor con el tiempo (CL39) y el cambio de color con el tiempo (CL40) eran fuertes, lo que sugiere que los parámetros incluidos en el CP1 estaban relacionados principalmente con el color de la espata.

El CP2 del PCA mostró una fuerte contribución positiva a la presencia de mancha en la garganta de la espata (CL31) y al color de la mancha de la garganta en la espata (CL33). La posición de la parte más ancha en el limbo (CL10) y el color principal de la cara externa de la espata (CL34) se cargaron moderadamente en CP2, pero cargado negativamente en el color de la parte inferior del peciolo (CL6), en el color de tallo jóvenes (CL4) y el color principal del espádice justo antes de la emisión del polen (CL38), lo que indica que el CP2 es el factor principal que contribuye al color de la planta (peciolo, espádice, garganta de la espata, color externo de la espata).

En el CP3 presentó una fuerte contribución positiva a la ondulación del borde del limbo (CL18) y una carga negativa en la posición de la parte más ancha en el limbo (CL10) y a la presencia de manchas en el haz del limbo (CL15), lo que revela que el CP3 se encuentra relacionado principalmente con características de la hoja.

El CP4 y CP5 cargaron positivamente con el color de tallos jóvenes (CL4) y el color principal del espádice justo antes de la emisión del polen (CL38) respectivamente. Mientras que mostraron una carga negativa en la forma natural de la parte distal de la espata (CL26) y el porte del limbo (CL7) respectivamente, lo que significa que los parámetros incluidos en estos dos componentes estaban relacionados principalmente con el color de tallos y espádices, así como características de la espata y la hoja. En general, los componentes CP1 y CP2 constituyeron el 52.43 % de las variaciones morfológicas cualitativas totales con rasgos cualitativos relacionados con el color de la espata (Cuadro 12), la dirección y grado de contribución de los caracteres morfológicos cualitativos en los diferentes componentes principales se muestran en la Figura 7.

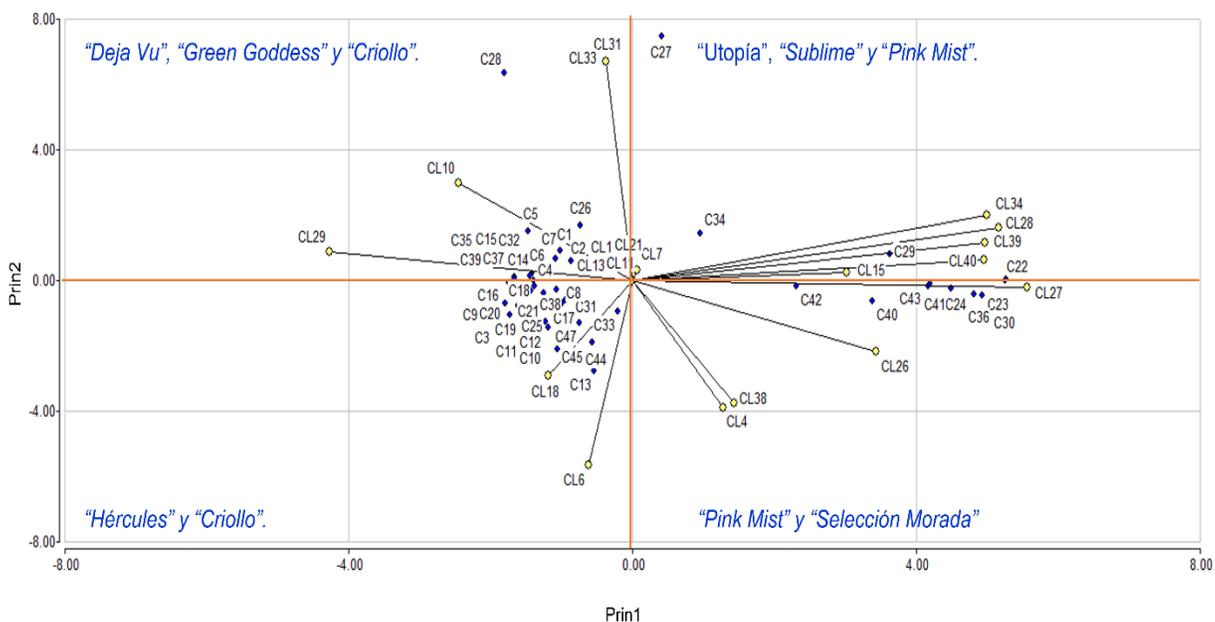


Figura 7. Biplot de 47 accesiones de alcatraz para los componentes principales uno (CP1) y dos (CP2). Las líneas indican la contribución (magnitud y dirección) de las 20 características morfológicas cualitativas en los componentes principales CP1 y CP2.

La aplicación de análisis estadísticos multivariados, como PCA, puede ayudar a comprender la relación entre las variables. Estos pueden ser útiles para deducir la naturaleza de los atributos y reducir la complejidad de la recopilación de datos (Al et al., 2012).

3.5.4 Análisis de conglomerados

Con el análisis de conglomerados, los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 47 UBC's evaluados en cinco grupos a una altura de corte de 0.05, dentro de un rango de 0.00 a 0.30. Se utilizó la técnica de Ward para realizar el análisis de agrupamiento jerárquico aglomerativo.

El dendrograma resultante se muestra en la Figura 8. Se obtuvo un coeficiente de correlación cofenética (r)= 0.82. Según Sneath y Sokal (1973) los valores " r " del coeficiente cofenético, oscilan entre 0.6 y 0.95 entendiéndose los más altos valores como indicadores de una buena correspondencia entre la matriz original y su representación a través de un dendrograma.

Sin embargo, valores bajos de esta correlación no necesariamente indican que el dendrograma obtenido no sea de utilidad, sino que solamente estaría indicando algún tipo de distorsión al momento de obtener el dendrograma (Aubert et al., 2021; Rohlf, 1982).

El primer grupo contenía 2 accesiones, se formó de “Deja Vu” y “Utopía”, dos de las nuevas variedades o cultivares que formaron el grupo más divergente. El segundo grupo contenía 9 accesiones, la agrupación incluyó a “Sublime”, “Hércules” y “Green Goddess” colectado de La Perla y Elotepec, Ver. El tercer grupo abarcó 3 accesiones y consistió en seedlings de “Pink Mist” solo de hojas maculadas. El cuarto grupo se formó de 14 accesiones, unió seedlings de “Pink Mist”, “Green Goddess” colectado en Tuzantla y “Criollo” colectados en La Perla, Tuzantla y Elotepec, Ver. El quinto grupo se constituyó de 19 accesiones entre ellas se encontraron; seedlings de “Pink Mist” y “Criollo” colectado en La Perla, Tuzantla y Elotepec, Ver., Chapingo, Edo. de México.

El dendrograma obtenido para rasgos morfológicos cualitativos se muestra en la Figura 9. Los caracteres cualitativos discriminaron a los 47 UBC’s en siete grupos a una altura de corte de 0.038, con un coeficiente de correlación cofenética (r)= 0.70. El primer grupo se constituye de 2 accesiones; de “Selecciones blancas con tonos violetas” (C42 y C40).

El segundo grupo se formó de 8 accesiones; que incluyó a todos los seedlings de “Pink Mist”. El tercer grupo consistió en 2 accesiones; “Deja Vu” y “Utopía”. El cuarto grupo se integró de 6 accesiones, entre ellas; “Criollo” colectado en Tuzantla, Veracruz; y Chapingo, Edo. de México. El quinto grupo se integró de 5 accesiones, entre ellas; los cultivares “Green Goddess” caracterizados en La Perla y Elotepec, Veracruz. El sexto grupo contenía 13 accesiones, consistió en “Criollos” colectados en Tuzantla y Elotepec, y de “Green Goddess” caracterizado en Tuzantla, Veracruz. El séptimo grupo se formó de 11 cultivares; “Hércules”, “Sublime” y “Criollo” colectado en La Perla y Tuzantla, Veracruz.

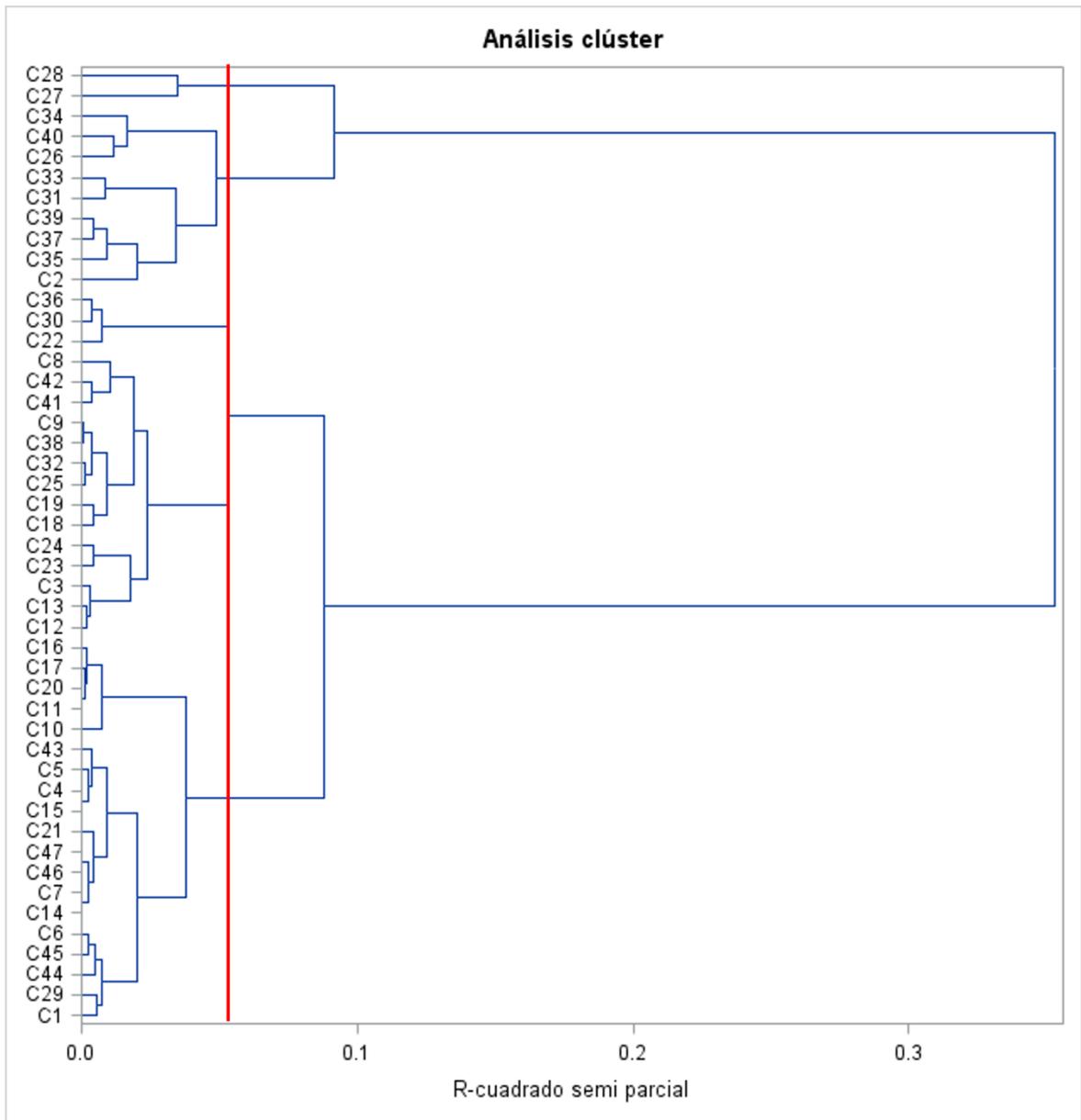


Figura 8. Dendrograma conformado a partir de datos cuantitativos, mediante el método de agrupamiento Ward, para 47 colectas de alcatraz.

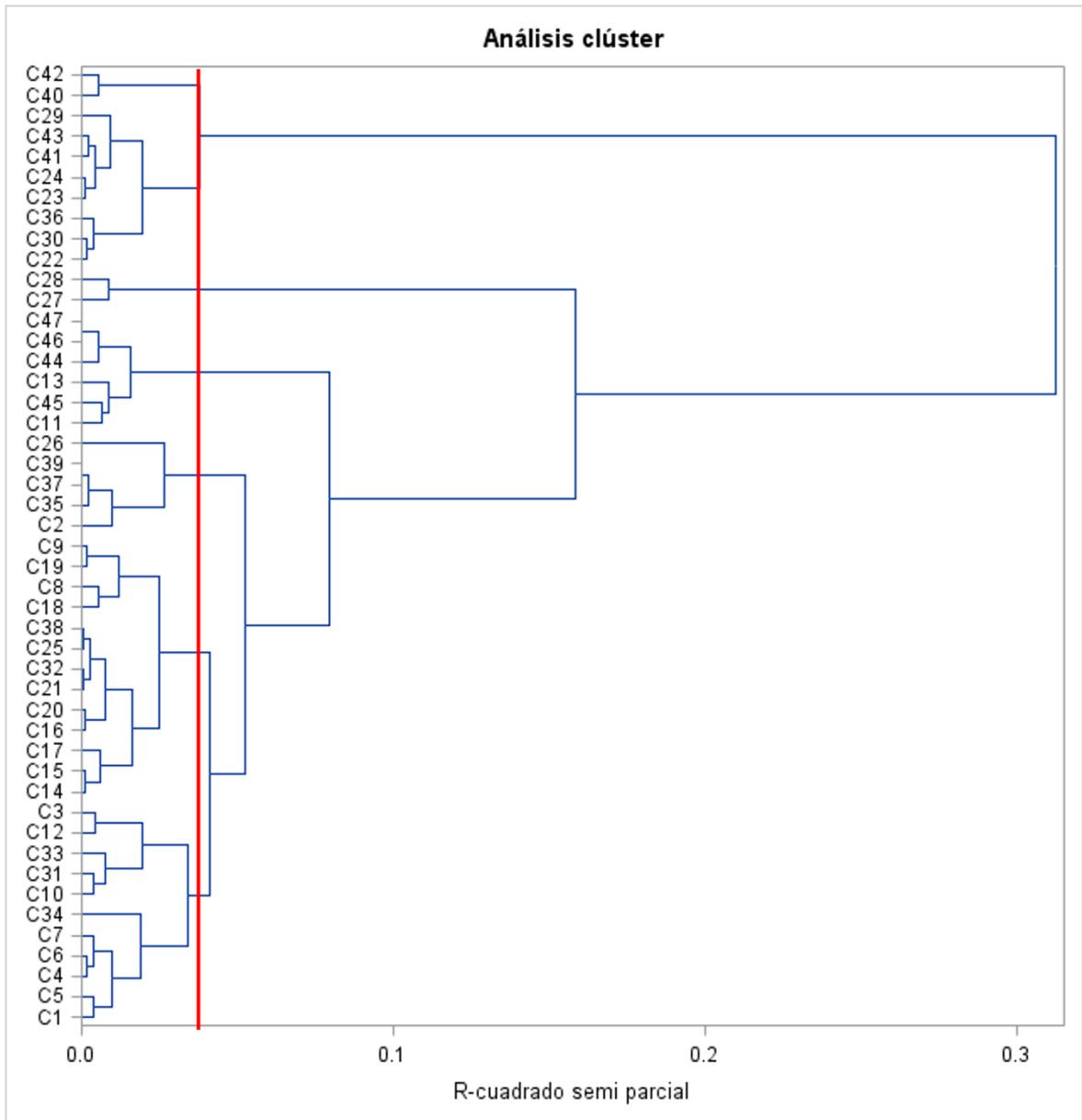


Figura 9. Dendrogramas conformado a partir de datos cualitativos mediante el método de agrupamiento Ward, para 47 colectas de alcatraz.

3.6 CONCLUSIONES

El alcatraz (*Z. aethiopica*.) es un cultivo subutilizado y de asociación. Este estudio ha demostrado una diversidad morfológica considerable de rasgos cualitativos y cuantitativos entre las accesiones de alcatraz colectadas.

Las características cualitativas y cuantitativas estudiadas mostraron interrelación entre ellas. Con base en los valores propios de PCA, los rasgos cualitativos relacionados con el color de la espata, espádice y tallos contribuyeron en gran medida a la diversidad total del germoplasma, así como los caracteres cuantitativos longitud y anchura del limbo, altura y longitud de la espata, longitud del peciolo y altura de la planta. La diversidad fenotípica del germoplasma estudiado es importante para su conservación.

3.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Juan Martínez Solís y al Dr. Juan Guillermo Cruz Castillo por la conducción y revisión de este trabajo y por facilitar el material empleado en esta investigación y al Ing. Yair Alejandro Cruz Marcial por su apoyo en la realización de este experimento.

3.8 LITERATURA CITADA

- Aghaei, M. J., Mozafari, J., Taleei, A. R., Naghavi, M. R., & Omid, M. (2008). Distribution and diversity of *Aegilops tauschii* in Iran. *Genetic resources and crop evolution*, 55, 341-349.
- Al-Sayed, H. M., Fateh, H. S., Fares, W. M., & Attaya, A. S. (2012). Multivariate analysis of sugar yield factors in sugar cane. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 6(1), 44-50.
- Aubert C. R. F., Quispe F. M. M., Muñiz D. G. & Blas S. R. H. (2021). Comparación de tres coeficientes de similitud para análisis con marcadores moleculares AFLP en *Lupinus mutabilis* Sweet. *Manglar: Revista de Investigación Científica*, 18(3), 301-307
- Balduzzi, M., Binder, B. M., Bucksch, A., Chang, C., Hong, L., Iyer-Pascuzzi, A. S & Sparks, E. E. (2017). Reshaping plant biology: qualitative and quantitative descriptors for plant morphology. *Frontiers in Plant Science*, 8, 117.
- Davidsson, P. R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, E. T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in plant science*, 4, 191.
- Friedt, W., Snowdon, R., Ordon, F., & Ahlemeyer, J. (2007). Plant breeding: assessment of genetic diversity in crop plants and its exploitation in breeding. In K. Esser, U. Löttge, W. Beyschlag, and J. Murata (Eds.), *Progress in Botany 68* (pp. 151-178). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-36832-8_7
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-36832-8_7
- Funnell, K. A. (2006). *The genus Zantedeschia: Botanical classification and morphology*. Calla Growers' Handbook. Massey University. Palmerston North. New Zealand Calla Council. (Original work published 1994).
- Giraldo, E., López-Corrales, M., & Hormaza, J. I. (2010). Selection of the most discriminating morphological qualitative variables for characterization of fig germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(3), 240-249.

- Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Jr. A. D., Karasawa, M., & Sudré, C. P. (2008). Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, 7(4), 1289-1297.
- Hotelling, H. (1951). A generalized T test and measure of multivariate dispersion. In *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability* (pp. 23-41). The Regents of the University of California. <https://projecteuclid.org/euclid.bsmsp/1200500217>
- Johnson, E. D. (1998). Discriminant analysis. In E. D. Johnson (Ed.), *Applied Multivariate Methods for data Analysts*. Duxbury Press Brookes/Cole Publishing Company.
- Karimi, H. R., Zamani, Z., Ebadi, A., & Fatahi, M. R. (2009). Morphological diversity of Pistacia species in Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 561-571.
- Martínez-Calvo, J., Gisbert, A. D., Alamar, M. C., Hernandorena, R., Romero, C., Llácer, G., & Badenes, M. L. (2008). Study of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by multivariate analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 695-703.
- Rohlf, F. J. (1982). Consensus indices for comparing classifications. *Mathematical biosciences*, 59(1), 131-144.
- Sarjani, T. M., Mawardi, M., Pandia, E. S., & Wulandari, D. (2017). Identifikasi morfologi dan anatomi tipe stomata famili Piperaceae di kota Langsa. *Jurnal IPA & Pembelajaran IPA*, 1(2), 182-191.
- SAS (Statistic Analisis System). (1990). Institute Inc., Cary North Carolina, EE. UU.
- Singh, S., Prakash, A., Chakraborty, N. R., Wheeler, C., Agarwal, P. K., & Ghosh, A. (2016). Trait selection by path and principal component analysis in *Jatropha curcas* for enhanced oil yield. *Industrial Crops and Products*, 86, 173-179.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification* (1st ed.), W. H. Freeman & Co.

- Uyeda, J. C., Caetano, D. S., & Pennell, M. W. (2015). Comparative analysis of principal components can be misleading. *Systematic Biology*, 64(4), 677-689.
- Ward Jr, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American statistical association*, 58(301), 236-244.
- 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.
- Williams, W. T. (1976). Meaning of pattern. In W.T. Williams (Ed.), *Pattern Analysis in Agricultural Science* (pp. 29-124). CSIRO, Melbourne, Elsevier. <http://hdl.handle.net/102.100.100/304717?index=1>

4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 47 ACCESIONES DE ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng)

4.1 RESUMEN

La cala o alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) es una planta perenne herbácea que crece a partir de rizomas. Con el propósito de proporcionar información base para llevar a cabo un programa de mejoramiento de este cultivo, se genotiparon un total de 47 accesiones, provenientes de distintas localidades del Estado de Veracruz y Edo. de México. Se estimó la diversidad genética existente entre las accesiones utilizando marcadores Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR Inter Simple Sequence Repeats). Se usaron 22 iniciadores y se obtuvo un polimorfismo general del 83.51 %. Se utilizó el índice de similitud de Jaccard transformado en distancia: $d_{ij} = (\sqrt{1 - S_{ij}})$. El análisis de agrupamiento se realizó con el método jerárquico de la varianza mínima de Ward el cual se representó en un dendrograma. Se realizó la descriptiva de los iniciadores evaluados para identificar aquéllos con mayor contenido de información polimórfica y por tanto de mayor utilidad en la discriminación entre accesiones. Con el objetivo de evaluar la distribución de la variabilidad se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) ($P < 0.0001$), el cual reveló que ésta se presentó en mayor medida dentro de las poblaciones evaluadas. Adicionalmente se calculó el índice de información de Shannon-Weaver (I) el cual presentó un valor general de $I=0.69$. El presente estudio representa uno de los pocos trabajos realizados en el estudio de la variabilidad genética presente en distintas accesiones de *Z. aethiopica* en México.

Palabras clave: *Zantedeschia*, ISSR, polimorfismo, diversidad genética, índice de Shannon.

4.2 ABSTRACT

Calla lily or alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) is an herbaceous perennial plant that grows from rhizomes. With the aim of providing base information for a breeding program of this crop, a total of 47 accessions coming from different localities of Veracruz and Edo. de México were genotyped. Genetic variability present among accessions was evaluated using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. A set of 22 ISSR primers was used, getting an overall polymorphism of 83.51 %. Genetic similarities were assessed through Jaccard's similarity index transformed into genetic distances: $d_{ij} = (\sqrt{1 - S_{ij}})$. Hierarchical clustering analysis was performed using Ward's minimum variance approach and a dendrogram was generated. Primer's description analysis was done in order to identify those with the highest polymorphic information content, useful for accretions discrimination. To evaluate the distribution of genetic variability an analysis of molecular variance was performed (AMOVA) ($P < 0.0001$), which revealed a higher degree of variability located within populations. Shannon-Weaver information index (I) had an overall value of $I=0.69$. The present study represents one of the first molecular insights into genetic variability present in accessions of *Z. aethiopica* in Mexico.

Key words: *Zantedeschia*, ISSR, polymorphism, genetic diversity, Shannon index.

4.3 INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia *Araceae* el género *Zantedeschia* contiene ocho especies de plantas herbáceas, perennes y con flores que son autóctonas del sur de África, desde Malawi hasta Sudáfrica. Debido a su extraordinaria espata floral (pétalo exterior con forma de embudo) y hojas decorativas este cultivo tiene gran popularidad en todo el mundo (Slaughter et al., 2012). El género se clasifica en dos secciones: la sección *Zantedeschia* y la sección *Aestivea*. El desarrollo de nuevos cultivares es importante para la rentabilidad de la industria florícola. Hasta el momento hay un número limitado de cultivares de *Zantedeschia aethiopica*, debido a la incompatibilidad de cruces interespecíficos dentro el género (Reznik et al., 2021). La hibridación interespecífica convencional entre las dos secciones no puede darse debido a la degeneración del endospermo, el crecimiento anormal del embrión y la detención del desarrollo de los plastidios, efectos conocidos de la incompatibilidad plastoma-genoma (IGP) (Yao, 1992).

La mayoría de las variedades actuales son el resultado de mutaciones espontáneas o mejoramiento clásico dentro de la especie, seguido de un largo proceso de selección (Reznik et al., 2021). El mejoramiento ha producido la selección enana “Childsiana”, la variedad de espata rosa “Pink Mist” y la muy popular “Diosa Verde”, que tiene una espata verde. “Colombe de la Paix” fue escogida por su abundante floración y el cultivar “Crowborough” fue elegido por su tolerancia al frío (Reznik et al., 2021). Un ejemplo más reciente de cultivares clásicos criados y seleccionados son las primeras tres variedades de alcatraz generadas en México: “Deja Vu” (Cruz & Torres, 2017), “Utopía” y “Sublime” (Cruz & Hernández, 2022).

Cada planta en la naturaleza debe tener rasgos morfológicos y anatómicos únicos. Las plantas pertenecientes a un mismo género presentarán variaciones morfológicas y anatómicas (Sarjani et al., 2007).

Por lo que el desarrollo de nuevos cultivares requerirá contar con información referente a la relación genética entre los posibles padres utilizando enfoques morfológicos y moleculares (Pabendon et al., 2007). La diversidad genética existente dentro y entre poblaciones vegetales se puede evaluar teniendo en cuenta caracteres morfológicos tanto cualitativos como cuantitativos, aunque esta caracterización es menos fiable que la molecular debido a la influencia de factores ambientales en su expresión (Massawe et al., 2002). Los avances en la tecnología de marcadores moleculares en los últimos años han proporcionado alternativas efectivas a las técnicas clásicas de caracterización morfo-fenotípica. Como los marcadores moleculares no están influenciados por ningún factor físico o bioquímico, permiten la identificación de cultivares en las primeras etapas de desarrollo (Chen et al., 2009).

Los marcadores moleculares proporcionan resultados más precisos y auténticos para evaluar la variación existente en las razas locales en comparación con los enfoques convencionales (Gupta & Varshney, 2000). Los marcadores moleculares también se pueden usar para rastrear el origen de los genotipos y emplearse directamente en programas de fitomejoramiento (Mayes et al., 2015). Actualmente el uso de marcadores moleculares se ha convertido en una herramienta muy poderosa para el manejo y la utilización de la variabilidad genética de cultivos en las colecciones de germoplasma. En el caso de *Zantedeschia* spp. algunos tipos de marcadores como las Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), se han aplicado ampliamente para la identificación de cultivares (Hamada & Hagimori, 1996; Lu et al., 2012), cuantificar los niveles de variación y relación genética (Zhang et al., 2009) y describir el flujo de genes y la paternidad en las accesiones de germoplasma (Li, 2011).

Uno de los marcadores moleculares más eficaces son los ISSR ya que se pueden aplicar con éxito a la identificación y caracterización del genoma vegetal.

La principal ventaja de ISSR es que producen múltiples bandas en el mismo locus, son altamente reproducibles, y no necesitan ninguna información genómica previa (Oumer et al., 2020).

El enfoque clásico de la selección está influenciado por las condiciones de crecimiento de las plantas y los sesgos individuales, lo que dificulta la tarea de identificación de nuevos genotipos/cultivares (Sharma et al., 2011). Por lo que el conocimiento sistemático de los recursos genéticos de los alcatraces o calas es importante para la formulación de estrategias de conservación y también para la mejora cualitativa del género *Zantedeschia* y especies relacionadas. En el presente estudio se usaron 22 iniciadores ISSR para estimar el grado de variación y relación genética entre 47 accesiones de alcatraz con el objetivo de proporcionar información básica para la conservación y protección de genotipos existentes en México, así como proporcionar información útil para el establecimiento de un programa de mejoramiento genético efectivo para este cultivo.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Colecta de material vegetal

En la región centro-oriente de México se realizaron 47 colectas de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) en distintas localidades de los estados de Veracruz y Edo. de México (Figura 10) durante el mes de febrero de 2022. La región muestreada se dividió en 4 áreas ecológicas: el grupo A estuvo integrado por 5 individuos silvestres colectados en el municipio de La Perla, el grupo B incluyó 16 individuos colectados en la localidad de Tuzantla, municipio de la Perla, Veracruz. El grupo C correspondió a 22 individuos seleccionados entre líneas y las nuevas variedades mexicanas generadas, los cuales fueron colectados en el municipio de Elotepec, Veracruz. Finalmente, el grupo D estuvo integrado por 4 individuos silvestres colectados en Chapingo-Textcoco, Edo. de México.

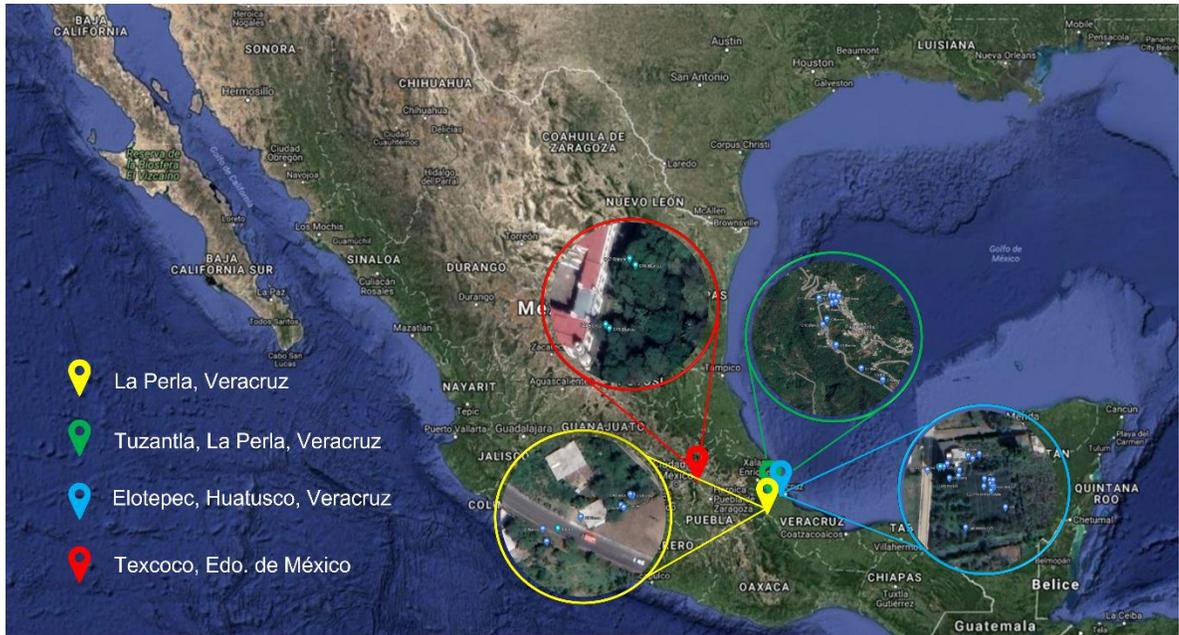


Figura 10. Sitios geográficos de colectas de tejido vegetal de alcatraz, procedentes de la zona centro-oriente de México.

Se colectaron hojas jóvenes y sanas, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas previamente desinfectadas con alcohol al 70 % y etiquetadas. Las muestras fueron colocadas en refrigeración y transportadas al Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la Universidad Autónoma Chapingo a partir de las cuales se realizó la extracción de ADN. Cada población fue considerada como una unidad básica de caracterización (UBC).

4.4.2 Genotipos empleados

Colectas. Se obtuvieron 26 colectas procedentes de los estados de Veracruz y Edo de México, consideradas como UBCs (Unidades Básicas de Caracterización), las cuales mostraban variabilidad fenotípica con respecto a caracteres como altura de planta, tamaños y formas de hojas y espatas. La tonalidad de espatas dominante en las colectas fue el color blanco o “criollo”, el alcatraz más común en México (UAM, 2016).

Líneas. Se caracterizaron tres líneas o cultivares: 'Green Goddess', 'Hércules' y seedlings de 'Pink Mist'. Entre ellas se seleccionaron 16 UBCs obtenidas en la localidad de Elotepec Municipio de Huatusco, Veracruz. Los materiales escogidos presentaron diferencias en tonos, tamaños y formas de espatas u hojas, así como manchas en el haz (hojas maculadas).

Variedades derivadas. Adicionalmente dentro de este sitio se consideraron las tres primeras variedades o cultivares de alcatraz mexicanas: “Deja Vu” (Cruz & Torres, 2017), “Utopía” y “Sublime” (Cruz & Hernández, 2022). Del sitio de colecta se seleccionaron 5 UBCs, tres genotipos registrados y 2 genotipos en evaluación obtenidos a partir de las líneas antes citadas provenientes del estado de Veracruz.

4.4.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó usando el protocolo de CTAB (Doyle,1991). Cada material fue sanitizado con alcohol al 70 %, posteriormente se tomó 0.9 g de hojas jóvenes de cada accesión colectada y el tejido se colocó dentro de un mortero estéril al que se le añadió nitrógeno líquido hasta cubrir la muestra, la cual se molió hasta obtener un polvo fino. El tejido pulverizado se transfirió a microtubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían 900 µL de amortiguador de extracción (Tris HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 2-mercaptoetanol 0.2 %, CTAB 2 %, pH 8.0) previamente precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®.

El microtubo se agitó hasta homogeneizar y se calentó nuevamente a 65 °C en el termoblock durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar e inmediatamente se colocaron en una centrifuga marca Thermo® durante 10 min a 21000 gravedades. El sobrenadante recuperado se transfirió a microtubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se les agregó 4 µL de ARNasa. Éstos se incubaron por 20 min a temperatura ambiente o a 37°C.

Luego se agregaron 600 μL de cloroformo frío-alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron por inversión suave durante 2 minutos hasta obtener una emulsión. Posteriormente se centrifugaron a 12000 xg durante 10 minutos. La fase acuosa se separó en la parte superior de los tubos y se colocó en otros microtubos a los cuales se les agregaron 500 μL de isopropanol frío, se agitaron suavemente por inversión hasta obtener el precipitado que correspondió a los ácidos nucleicos. Los tubos se colocaron a -20°C durante 30 min. Luego se centrifugaron a 21000 xg por 5 minutos, se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla de ADN y se escurrió sobre una toalla sanitaria. Se secó en el termoblock a 40°C durante aproximadamente 15 minutos y finalmente ésta se disolvió en 50 μL de TE. Las muestras obtenidas se conservaron a 4°C para su posterior uso.

4.4.4 Cuantificación de la pureza y calidad del ADN

Las muestras de ADN fueron cuantificadas en el espectrofotómetro “NanoDrop Lite” de “Thermo Scientific”. Se utilizaron 4 μL de TE para la calibración del equipo cada 30 minutos una vez iniciada la cuantificación de las muestras. A continuación, se tomaron 4 μL de ADN disuelto en amortiguador TE y se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 260 nm (Cuadro 13) y se registró la concentración estimada en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ así como la relación 260/280 (Cuadro 14).

Cuadro 13. Intervalo de valores de la relación 260/280 (λ) indicador de la pureza del ADN aislado.

Valor (λ)	Pureza
1.8 – 2	ADN con pureza óptima
1.6 – 1.8	ADN con pureza aceptable
< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
> 2.1	Contaminación por ARN
< 1.5	Contaminación por sales, carbohidratos y fenoles.

Cuadro 14. Concentración en ng/ μ L y relación 260/280 de tejido vegetal de las 47 UBCs de *Z. aethiopica*.

UBC	Estado	Tejido de extracción	[ng/ μ L]	Relación 260/280
C1	Veracruz	Hoja	1601.5	1.88
C2	Veracruz	Hoja	2101.4	1.90
C3	Veracruz	Hoja	1983.9	1.91
C4	Veracruz	Hoja	1548.3	2.00
C5	Veracruz	Hoja	1763.8	1.93
C6	Veracruz	Hoja	988.9	1.97
C7	Veracruz	Hoja	1844.4	1.92
C8	Veracruz	Hoja	1199	1.90
C9	Veracruz	Hoja	2020.7	1.96
C10	Veracruz	Hoja	1197.3	1.93
C11	Veracruz	Hoja	1805.5	1.85
C12	Veracruz	Hoja	1175	1.98
C13	Veracruz	Hoja	1481.7	1.89
C14	Veracruz	Hoja	1625.9	1.87
C15	Veracruz	Hoja	1010.6	1.74
C16	Veracruz	Hoja	1007.9	1.83
C17	Veracruz	Hoja	1961	1.90
C18	Veracruz	Hoja	2060	1.84
C19	Veracruz	Hoja	1606.4	1.83
C20	Veracruz	Hoja	1559.5	1.85
C21	Veracruz	Hoja	1484.4	1.93
C22	Veracruz	Hoja	648.2	1.65
C23	Veracruz	Hoja	992.4	1.58
C24	Veracruz	Hoja	841.3	1.69
C25	Veracruz	Hoja	619	1.82
C26	Veracruz	Hoja	528.8	1.84
C27	Veracruz	Hoja	664.8	1.72
C28	Veracruz	Hoja	875.8	1.87
C29	Veracruz	Hoja	594.2	2.08
C30	Veracruz	Hoja	1726.3	1.94
C31	Veracruz	Hoja	2055.3	1.94
C32	Veracruz	Hoja	1752.1	1.95
C33	Veracruz	Hoja	1458.2	2.03
C34	Veracruz	Hoja	886.3	1.92
C35	Veracruz	Hoja	1005.9	1.97
C36	Veracruz	Hoja	1728.2	2.00

UBC	Estado	Tejido de extracción	[ng/ μ L]	Relación 260/280
C37	Veracruz	Hoja	2118.2	1.86
C38	Veracruz	Hoja	1362	1.99
C39	Veracruz	Hoja	1486.8	1.80
C40	Veracruz	Hoja	1477.8	1.90
C41	Veracruz	Hoja	1661.9	1.91
C42	Veracruz	Hoja	1544.9	1.98
C43	Veracruz	Hoja	1186.9	1.98
C44	Edo. de México	Hoja	2098.1	1.90
C45	Edo. de México	Hoja	2248.5	1.85
C46	Edo. de México	Hoja	2102.6	1.86
C47	Edo. de México	Hoja	2136.7	1.87

Finalmente, a partir de las concentraciones obtenidas cada una de las muestras de ADN fue diluida a una concentración final de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ usando agua de grado molecular, la cual se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \quad V_1 = \frac{(10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})(100 \mu\text{L})}{C_1}$$

La calidad del ADN se comprobó en un gel de agarosa al 2.0 % y TAE al 1X de 4 mm de grosor el cual se corrió por 40 minutos a 160 voltios en TAE al 0.25X. En cada pozo se depositaron $10 \mu\text{L}$ de la solución de trabajo con ADN. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio a una concentración de $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ durante 10 min. En seguida se documentó mediante un transiluminador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition. El ADN de las muestras se reveló como manchas uniformes. Como prueba adicional para comprobar la calidad del ADN se realizó una prueba de amplificación mediante PCR del gen 16s y electroforesis de las muestras en gel de agarosa al 2.0 %.

4.4.5 Amplificación y separación de patrones ISSR

Se realizaron las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) con 22 iniciadores (Cuadro 15).

El ciclo de amplificación consistió en una fase de predesnaturalización a 93° C por 1 min, una fase de desnaturalización a 93°C por 20 s seguida de cuarenta ciclos, cada uno de ellos con 1 min en función de la temperatura de alineamiento de cada iniciador para las 47 muestras, seguido de 20 s a 72 °C para la fase de extensión y una extensión final a 72°C por 6 min. Para concluir, las muestras se enfriaron hasta 4°C (Cuadro 16).

Cuadro 15. Iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular colectas de alcatraz.

No.	Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Ta (°C)	NB
1	ISSR 1	(CA) ₈ AAGG	60	20
2	ISSR 2	(CA) ₈ AAGGT	62	21
3	ISSR 3	(GA) ₈ CTC	58	19
4	ISSR 4	(AG) ₈ CTC	58	19
5	ISSR 5	(AC) ₈ CTA	56	19
6	ISSR 6	(AC) ₈ CTG	58	19
7	ISSR 7	(AG) ₈ CTG	58	19
8	ISSR 8	(AC) ₈ CTT	56	19
9	ISSR 9	A(GA) ₇ GC	50	17
10	ISSR 10	(GA) ₈ T	50	17
11	LOL 7	(GA) ₆ CC	44	14
12	LOL 8	(GT) ₆ CC	44	14
13	LOL 9	(CAC) ₃ GC	38	11
14	LOL 10	(GAC) ₃ GG	38	11
15	17899 A	(CA) ₆ AG	42	14
16	17898 B	(CA) ₆ GT	42	14
17	MELS 1	(CA) ₆ GG	44	14
18	MELS 2	(GA) ₆ GG	44	14
19	MELS 3	(TG) ₇ G	46	15
20	PIO 1	CA) ₆ AGCT	60	16
21	PIO2	(CA) ₆ AGG	46	15
22	PIO 3	AGCT(GACA) ₃	58	16

Ta=Temperatura de alineamiento, A=adenina, G=guanina, C=citocina, T=timina y NB=número de bases.

Cuadro 16. Ciclos y temperaturas de amplificación de la PCR para la obtención de los patrones ISSR.

Fase	T °C	Tiempo	Ciclos
Predesnaturalización	93	1 min	1
Desnaturalización	93	20 s	
Alineamiento	•	1 min	40
Extensión	72	20 s	
Extensión final	72	6 min	1
Enfriamiento	10	∞	

•: Ta. es variable al tipo de iniciador (Consultar Cuadro 8)

Para cada colecta se marcó un microtubo Eppendorf y se procedió a preparar una mezcla maestra para las 22 reacciones, con los ingredientes que se detallan en el Cuadro 17. Para cada colecta se agregaron 2.5 μL del ADN diluido a 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 22.5 μL de mezcla de reacción a los tubos marcados, con objeto de obtener un volumen final de 25 μL .

Cuadro 17. Composición de la mezcla maestra de reacción estándar para PCR en un volumen final de 25 μL .

Componente	Concentración inicial	Concentración Final	1x (μL)
H ₂ O	-	-	4.7
dNTP's	500 μM	200 μM	10.0
Amortiguador de PCR	10x	1x	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	3
Iniciador	10 $\text{ng}/\mu\text{L}$	30 ng	2
Taq	5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.5 $\text{U}\cdot\text{reac}$	0.3
ADN	10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	25 $\text{ng}\cdot\text{reac}$	2.5
Total			25

4.4.6 Separación de productos amplificados

Los productos amplificados obtenidos a partir de la PCR fueron separados en geles de agarosa por electroforesis durante 45 minutos a 160 voltios. A cada gel se les agregaron 2 μL de amortiguador de carga Blue Juice 10 X. En cada pocillo del gel de agarosa se cargaron 8 μL de los productos amplificados. Para cuantificar el peso molecular de las bandas generadas por cada iniciador, en el último pozo del gel se cargaron 5 μL de la escalera de 100 bp. Para visualizar las bandas el gel se sumergió en una solución fijadora con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y TAE 1 X) durante 15 min y los resultados obtenidos sometieron a un transiluminador marca UVP y se analizaron usando el paquete Doc-It LS Image Acquisition.

Los geles así obtenidos se analizaron cuantificando el número de bandas polimórficas producto de la amplificación para cada iniciador. La presencia de una banda se codificó como 1 y su ausencia como 0, con lo cual se construyó una matriz binaria básica de datos (MBD).

4.4.7 Análisis estadístico

A partir de la matriz básica de datos (MBD) de los 22 iniciadores se procedió a calcular el coeficiente de similitud de Jaccard (1912) entre pares de accesiones, el cual fue transformado en distancia genética $d_{ij} = (\sqrt{1 - S_{ij}})$ mediante el paquete SAS ver. 9.4.

4.4.7.1 Análisis de agrupamiento

Se realizó un análisis de agrupamiento usando el método jerárquico de la varianza mínima de Ward y se construyó un dendrograma. La altura de corte para definir el número de grupos se definió mediante el criterio cúbico de agrupamiento y las pseudo estadísticas T^2 (Hotelling, 1951) y la Pseudo F (Johnson, 1998).

4.4.7.2 Descriptiva de marcadores

Con el objetivo de identificar los iniciadores que brindan mayor información en la comparación entre accesiones se procedió a realizar el análisis descriptivo mediante el programa InfoGen® de la Universidad de Córdoba, Argentina. Por lo que se estimaron las siguientes variables: número de bandas polimórficas (BP), monomórficas (BM) y totales (BT), proporción de loci polimórficos (PMF), contenido de información polimórfica (PIC), error estándar del PIC (EE), porcentaje de amplificación (AMP), y la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA) calculada a través de: $P_i (X_D)^n$, donde X_D representa el índice de similitud promedio para todos los pares de comparaciones, calculado como $X_D = (2N_{AB})/(N_A + N_B)$, donde N_{AB} representa el número de bandas presentes en ambas muestras, N_A y N_B representan el número total de bandas en las muestras A y B respectivamente, y n representa el número promedio de productos de amplificación por muestra (Wetton et al., 1987).

4.4.7.3 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).

Con el objetivo de probar la existencia de diferencias genéticas entre poblaciones se procedió a realizar un análisis molecular de varianza (AMOVA) considerando las cuatro poblaciones de alcatraz determinadas geográficamente. Este análisis se efectuó con el paquete Infogen® de la Universidad de Córdoba, Argentina.

4.4.7.4 Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver

Para calcular la biodiversidad específica entre accesiones se procedió a estimar el índice de diversidad genética de Shannon-Weaver entre las cuatro poblaciones a través de la siguiente ecuación:

$$H' = - \sum_i^s P_{ij} \times \ln P_{ij}$$

donde: s denota el número de caracteres (bandas) consideradas y P_{ij} es la frecuencia del carácter i (banda i) en la población j .

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la extracción de ADN a partir de tejido vegetal (hoja) se obtuvieron lecturas de material genético que oscilaron de 528.8 hasta 2248.5 ng/ μ L (1464.43 ng/ μ L como promedio). Con respecto al paramero; relación de absorbancia 260/280 el 89.36 % de las muestras mostraron una calidad optima, 8.51 % registraron una calidad aceptable y el 2.13 % restante presentó contaminación con compuestos aromáticos.

Como pruebas adicionales para corroborar la calidad de extracción de ADN se elaboró un gel de calidad de agarosa en el cual se obtuvieron manchas o fragmentos uniformes. Adicionalmente se realizó una prueba de amplificación mediante PCR del gen 16s en la cual se obtuvo 100 % de amplificación.

Estos resultados muestran que la metodología de extracción de ADN de tejido vegetal de hojas de *Z. aethiopica* fue efectiva. En trabajo previos realizados en alcatraz se ha comprobado que la extracción de ADN en esta especie se puede realizar a partir de raíz, tubérculo, tallo, espata, inflorescencia pistilada, inflorescencia estaminada y semilla (Wei et al., 2016). En este último caso se pueden usar semillas inmaduras y semillas maduras cosechadas durante las etapas de antesis y marchitamiento (Wei et al., 2016).

4.5.1 Obtención de perfiles ISSRs

En el presente experimento se probaron 22 iniciadores ISSR, los cuales mediante PCR produjeron bandas nítidas y con polimorfismo (Figura 11).

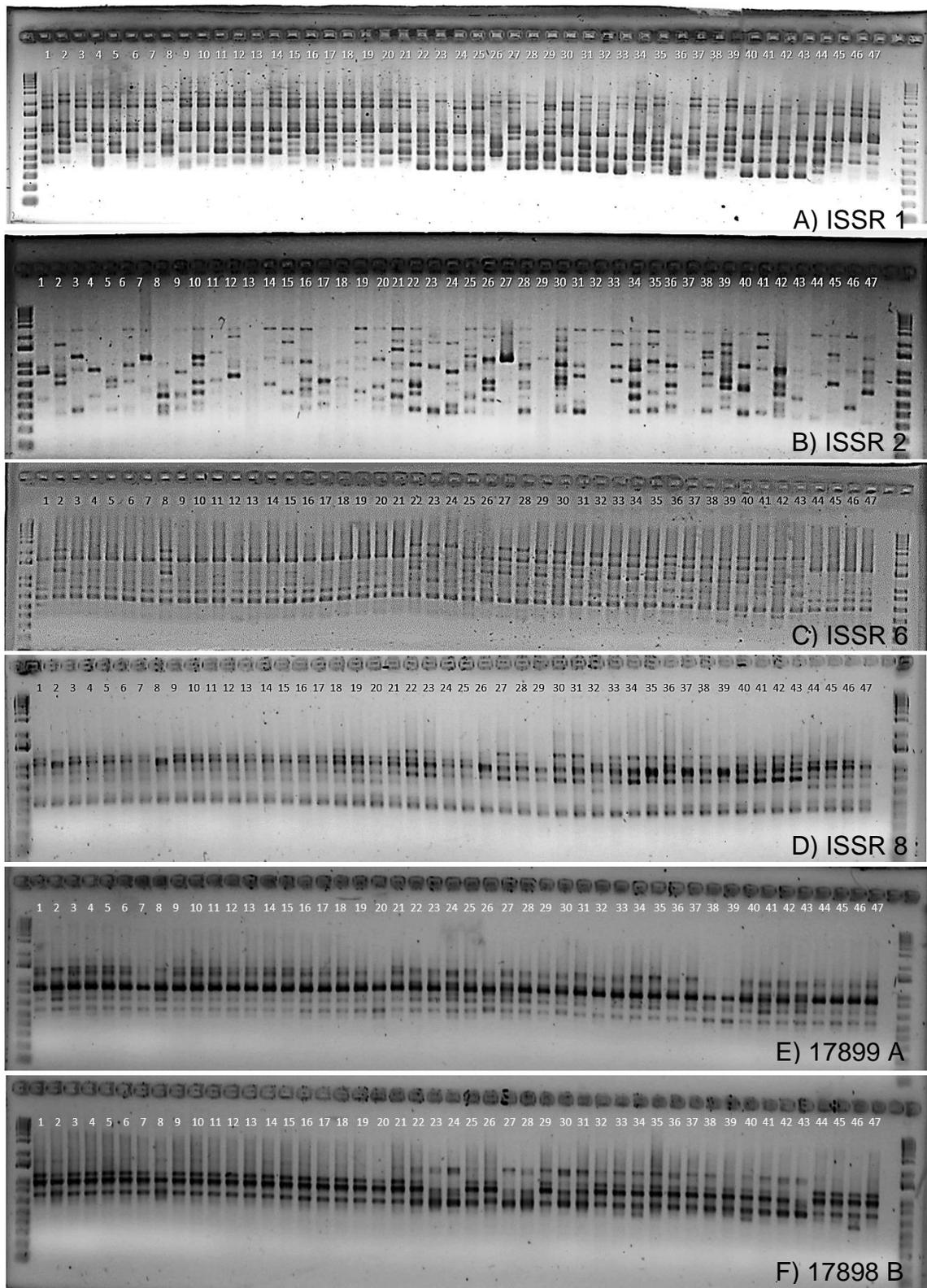


Figura 11. Perfiles moleculares de ISSR obtenidos con los iniciadores: A) ISSR 1; B) ISSR 2; C) ISSR 6; D) ISSR 8; E) 17899 A y F) 17898 en 47 colectas de alcatraz. Marcador de peso molecular (1 Kb) en ambos extremos.

Los perfiles analizados de alcatraz (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) revelaron que ninguna muestra se encuentra duplicada. De un total de 194 bandas amplificadas obtenidas 162 fueron bandas polimórficas, lo cual representó un polimorfismo general de 83.51 %. El número de bandas obtenidas por cada iniciador varió de 3 hasta 16 bandas, con un promedio de 8.82 bandas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang et al. (2009), indicaron que al evaluar variedades de calas de color (*Zantedeschia hybrid*) con 15 iniciadores ISSR obtuvieron un total de 109 bandas, 99 polimórficas (90 % de polimorfismo). En un experimento realizado por Zhen et al. (2013) mostraron cambios fisiológicos y bioquímicos producidos en dos variedades de cala expuestas a radiación con iones pesados $^{12}\text{C}^{6+}$ encontraron que la exposición pudo haber causado mutaciones del ADN genómico, lo cual provocó que con el uso de 22 iniciadores ISSR sólo produjera 45 % de polimorfismo

En estudios realizados con otros marcadores tipo AFLP en estudios sobre relaciones genéticas de especies en cultivares de *Aglaonema*, el número de fragmentos de AFLP generados por juego de iniciadores osciló entre 59 y 112, con tamaños de fragmentos entre 50 y 565 pb. Se detectaron un total de 449 fragmentos AFLP, de los cuales 314 fueron polimórficos (70 %) (Chen et al., 2004). Por lo que a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se demuestra que los marcadores de tipo ISSR proporcionaron una mayor cantidad de información en comparación a la utilización de marcadores dominantes por lo cual resultan de gran utilidad en estudios de variabilidad genética en esta especie. El iniciador que más bandas amplificó fue el ISSR2 con 16 bandas de las cuales el 100 % fueron polimórficas con un 28.06 % de amplificación a través de las 47 UBCs, un buen contenido de información polimórfica (0.30) y presentó la menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar (PDICMA), por lo que este iniciador muestra las mejores características para ser utilizado en estudios posteriores de caracterización molecular de *Z. aethiopica* por su alto grado de confiabilidad en la identificación de genotipos de esta especie.

Adicionalmente los iniciadores LOL 10 (0.36), MELS3 (0.34) e ISSR5 (0.31), también presentaron altos valores de contenido de información polimórfica por lo que podrían ser de interés en estudios moleculares posteriores (Cuadro 18).

Cuadro 18. Descriptiva de 22 iniciadores ISSR utilizados para la obtención de perfiles moleculares de alcatraz.

Primer	Secuencia	BP	BM	BT	PMF (95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	12	0	12	0.67	0.23	0.04	61.52	1.2E-08
ISSR2	(CA)₈AAGGT	16	0	16	1.00	0.30	0.01	28.06	4.4E-16
ISSR3	(GA) ₈ CTC	10	2	12	0.67	0.23	0.02	55.14	6.8E-07
ISSR4	(AG) ₈ CTC	7	2	9	0.67	0.29	0.02	63.27	6.6E-08
ISSR5	(AC) ₈ CTA	7	2	9	0.78	0.31	0.01	71.39	9.3E-09
ISSR6	(AC) ₈ CTG	12	1	13	0.69	0.22	0.03	36.07	1.3E-07
ISSR7	(AG) ₈ CTG	6	3	9	0.56	0.26	0.02	75.18	3.2E-06
ISSR8	(AC) ₈ CTT	7	3	10	0.50	0.21	0.02	60.43	5.3E-05
ISSR9	A(GA) ₇ GC	10	0	10	0.70	0.21	0.02	60.00	7.4E-07
ISSR10	(GA) ₈ T	6	2	8	0.63	0.21	0.01	81.65	1.8E-05
LOL7	(GA) ₆ CC	5	0	5	1.00	0.29	0.02	61.70	7.3E-11
LOL8	(GT) ₆ CC	5	3	8	0.63	0.30	0.01	71.81	1.5E-06
LOL9	(CAC) ₃ GC	6	1	7	0.86	0.30	0.01	75.08	1.7E-09
LOL10	(GAC) ₃ GG	2	1	3	0.67	0.36	0.01	68.79	3.7E-09
17899A	(CA) ₆ AG	6	2	8	0.63	0.22	0.01	68.62	9.6E-06
17898B	(CA) ₆ GT	7	1	8	0.88	0.23	0.01	50.53	1.4E-06
MELS1	(CA) ₆ GG	6	2	8	0.63	0.21	0.02	74.73	3.2E-05
MELS2	(GA) ₆ GG	6	0	6	0.67	0.23	0.02	43.62	3.4E-09
MELS3	(TG) ₇ G	4	2	6	0.67	0.34	0.01	57.80	4.6E-08
PIO1	CA) ₆ AGCT	7	2	9	0.67	0.25	0.02	77.78	6.2E-07
PIO2	(CA) ₆ AGG	9	0	9	0.89	0.24	0.02	60.28	9.3E-09
PIO3	AGCT(GACA) ₃	6	3	9	0.67	0.29	0.01	80.14	7.6E-07
Total		162	32	194				60.84	1.2E-157

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

4.5.2 Análisis de agrupamiento

Con los perfiles moleculares obtenidos se procedió a calcular el índice de similitud genética de Jaccard (1912) entre pares de accesiones, el cual se transformó en distancia = $(\sqrt{1 - S_{ij}})$. Luego se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el método de la varianza mínima de Ward y con los resultados obtenidos se procedió a elaborar un dendrograma. Con base en el criterio cúbico de agrupamiento y las pseudo estadísticas T^2 (Hotelling, 1951) y la Pseudo F (Johnson, 1998) se determinó que la distancia de corte era de $r^2 = 0.05$ lo cual clasificó a las 47 UBCs dentro de cuatro grupos principales (Figura 12).

El grupo I estuvo compuesto por 22 UBCs, las 5 accesiones colectadas en la localidad de La Perla zona centro (C1-C5), 13 materiales provenientes de Tuzantla y las 4 accesiones procedentes de Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. de México (C44 – C47). Este primer grupo de colectas tuvieron en común que la tonalidad dominante de las espatas fue el color blanco o “criollo”. El grupo II estuvo integrado únicamente por 5 UBCs, dos de ellas colectadas en La Perla centro (C2 y C89) y 3 provenientes de Elotepec, Veracruz (C35, C37 y C39). Estas colectas tuvieron en común que todas ellas pertenecieron a la variedad “Green Goddess”. El grupo III estuvo conformado por 12 UBCs colectadas en los municipios de Tuzantla y Elotepec, Veracruz con una gran diversidad entre ellas ya que incluyeron colectas tipo “Green Goddess”, seedlings de “Pink Mist”, colecta de las variedades “Hércules”, “Utopía” y “Sublime” así como accesiones tipo “Criollo” o de alcatraz blanco, por lo que dentro de este grupo se encontraron distintas tonalidades de espatas desde los tonos blancos, verdes/blanco, rosas y púrpura/blanco. En relación con los colores de hojas también se observaron máculas en algunos genotipos. Finalmente, el grupo IV estuvo conformado por 8 UBCs, colectadas en el municipio de Elotepec, Veracruz. Las accesiones incluidas en este grupo fueron principalmente seedlings de “Pink Mist”, “Deja Vu” y 2 genotipos en evaluación obtenidos a partir de las líneas antes citadas.

Nuevamente dentro de este grupo se presentó una amplia gama de colores que fueron del Blanco/purpura, lila, purpura y rosa, así como la presencia de hojas maculadas en algunas de ellas. Los resultados obtenidos sugieren que los marcadores tipo ISSR utilizados permitieron identificar variaciones genéticas a nivel intraespecífico, presentes entre las plantas de *Z. aethiopica*.

El agrupamiento representado en el dendrograma permite observar una clara diferenciación genética entre los genotipos “criollos” con respecto a las líneas e híbridos derivados, resultado de la selección artificial. Así también puede apreciarse la estructura genética de las distintas poblaciones, donde se aprecia la existencia de una amplia distribución espacial de genotipos susceptibles de ser incorporados dentro de programas de mejoramiento (Zhu et al., 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se asemejan a lo reportado en estudios anteriores realizados en calas, donde mediante la ayuda de marcadores EST—SSR fue posible estudiar la diversidad genética, caracterizar al germoplasma y realizar selección asistida dentro del género *Zantedeschia* (Wei et al., 2016). En otro estudio realizado por Wei et al. (2017) mostraron que no encontraron agrupamientos asociados con el origen geográfico de los materiales evaluados, lo cual fue explicado debido al probable intercambio extenso de accesiones parentales por parte de los programas de mejoramiento de los mejoradores en todo el mundo.

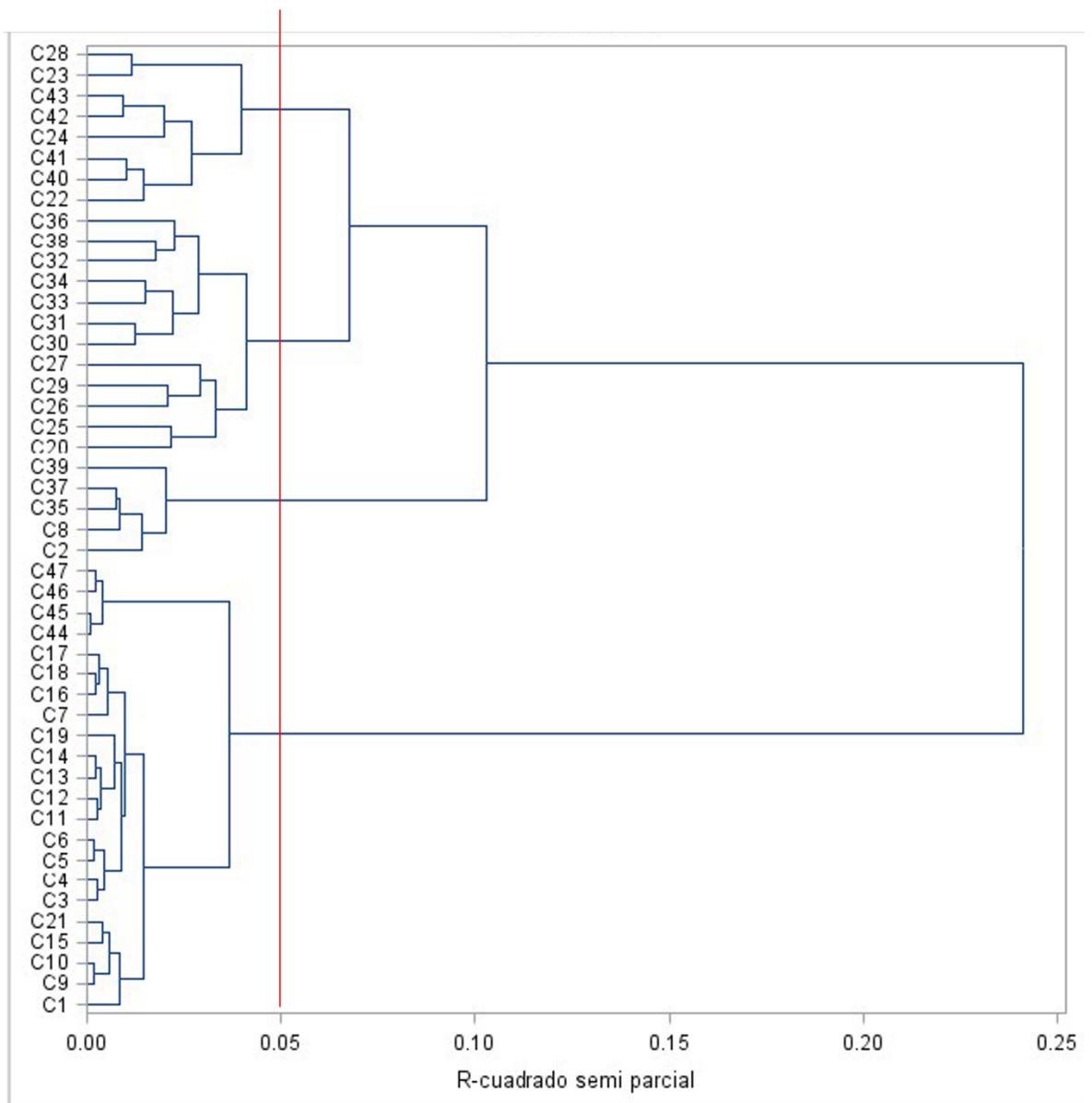


Figura 12. Dendrograma construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard entre muestras de *Z. aethiopica*.

4.5.3 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Con objeto de observar la distribución de la variabilidad genética de las accesiones evaluadas se procedió a realizar el análisis molecular de varianza (AMOVA) mediante el programa Infogen®. Éste reveló que la mayor variabilidad se presentó dentro de accesiones (79.62 %) ($P < 0.0001$), mientras que el 20.38 % restante se presentó entre accesiones (Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de accesiones de alcatraz o cala (*Z. aethiopica*) basado en datos ISSR.

F.V.	gl	SC	CM	p-valor	Componentes de Varianza	Variación (%)
Entre	3	11.39	3.80	<0.0001	0.27	20.38
Dentro	43	45.80	1.07	<0.0001	1.07	79.62
Total	46	57.19	1.24		1.34	100.00

No es inesperado que la mayor variación genética revelada por el AMOVA se presentó dentro de las poblaciones, resultado que coincide con lo encontrado por Wei et al., (2017), quienes en un estudio donde evaluaron 117 variedades de alcatraz de color con ETS-SSRs también detectaron un moderado nivel de diversidad genética (0.53) localizado dentro de poblaciones procedentes de USA, Nueva Zelanda y Países Bajos en lugar de entre poblaciones, lo cual fue atribuido al extenso intercambio de accesiones parentales entre programas de mejoramiento. Así mismo tiempo establecen que la distribución no aleatoria de genotipos puede deberse a distintos procesos que incluyen la dispersión restrictiva de genes, a la deriva genética y a la selección ambiental.

El conocer la estructura genética de las poblaciones de alcatrazes es un componente esencial en la caracterización de germoplasma e identificación de progenitores potenciales dentro de los programas de mejoramiento.

4.5.4 Índice de diversidad genética de Shannon-Weaver

El índice de diversidad de Shannon (Shannon, 1948), también conocido como índice de Shannon-Wiener, entropía de Shannon o índice de Shannon-Weaver, ha sido ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones. Se propuso como una medida unificadora de la diversidad para describir la variación en múltiples niveles de organización genética, desde polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP), especies enteras o unidades taxonómicas más grandes hasta ecosistemas (Gaggiotti et al., 2018; Sherwin, 2018). Sherwin et al. (2017) mostraron su potencial y utilidad en estudios genómicos, ya que su cálculo permite dimensionar la diversidad genética considerando un valor de cero cuando se presenta un alelo en la población y conforme aumenta el número de alelos, el valor también se incrementa y con ello la existencia de diversidad genética (Medrano, 2017; Pla, 2006).

Mediante la utilización de los marcadores ISSR se realizó el cálculo del índice de diversidad genética dentro de las cuatro poblaciones de *Z. aethiopica*, el cual varió desde 0.37 dentro de la población A hasta 0.69 en el resto de las poblaciones (Cuadro 20). La población A estuvo conformada por cinco individuos silvestres colectados dentro de la localidad de La Perla y fue la que presentó el mayor grado de variabilidad genética mientras que el resto de las poblaciones que sugiere que las poblaciones muestreadas presentaron el mismo grado de variabilidad a pesar de estar constituidas por diferente número de individuos y de distinto origen.

Cuadro 20. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en cuatro poblaciones de *Z. aethiopica*.

Especie	n	I	L _I	L _S	I _{Boot}	EE _{Boot}
Población A	5	0.37	0.24	0.47	0.37	0.06
Población B	16	0.69	0.68	0.69	0.69	4.4E-03
Población C	22	0.69	0.68	0.69	0.69	3.4 E-03
Población D	4	0.69	0.68	0.69	0.69	4.3 E-03
Total	4	0.69	0.69	0.69	0.69	0.03

n: número de muestras, I: índice de diversidad de Shannon-Weaver, L_I: Límite inferior, L_S: Límite superior, I_{Boot}: 1000 ciclos de remuestreo (Bootstrap) con intervalo de confianza de 0.95, EE_{Boot}: error del remuestreo.

Los valores del índice de Shannon-Weaver estimados en el presente estuvieron por debajo de los obtenidos por He et al. (2020), quienes mediante la utilización de 4 marcadores SSR evaluaron 134 cultivares de *Zantedeschia* colectados en China, Países Bajos, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Taiwán encontrando un valor alto de diversidad ($I = 0.934$). Esta discrepancia puede haberse debido al menor número de accesiones evaluadas en este trabajo (47) así como a su procedencia geográfica, ya que todas ellas provinieron de México.

El grado de diferenciación genética aumenta cuando la distancia entre poblaciones incrementa (Medrano, 2017; Pusadee et al., 2009). El índice de Shannon es más sensible a la pérdida de variantes raras (p. ej., debido a cuellos de botella genéticos) que a la pérdida de heterocigosidad, y proporciona más información acerca de la riqueza alélica o sobre un número simple de alelos (Sherwin et al., 2017).

Los resultados obtenidos sugieren que dentro del rango de colecta de alcatraces o calas explorado en este estudio la variabilidad genética no se ha reducido de manera drástica en comparación a la reportada en otros países. Sin embargo, sería recomendable realizar estudios adicionales que tomaran en cuenta otras poblaciones de *Z. aethiopica* considerando un mayor número de localidades, con objeto de tener una estimación más precisa de los cambios en la estructura y variación genética que pudieran presentarse, esto de acuerdo con lo sugerido por Konopiński (2020), quien establece que el uso de tamaños de muestra pequeños podría afectar el índice de diversidad presente, e incluso ocasionar un sesgo negativo.

4.6 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio se establece que los marcadores moleculares de tipo ISSR fueron altamente eficientes para el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones de alcatraces *Z. aethiopica*, mostrando un alto nivel de polimorfismo.

La mayor parte de la variabilidad genética en esta especie se concentró al interior de las poblaciones, siendo la región montañosa central del estado de Veracruz la más diversa.

Los productos ornamentales poseen atributos tangibles e intangibles que influyen en las decisiones de consumo, sugiriendo futuras oportunidades. La realización de análisis moleculares permite la identificación de grupos de genotipos genéticamente distantes entre líneas, híbridos y colectas que podrían emplearse como materiales parentales para generar nuevos cultivares en programas de mejoramiento genético de esta especie.

4.7 AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por la revisión y conducción de este trabajo y al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido, Departamento de Fitotecnia, UACH, así como al M.C. Placido Facundo Angel por su asesoría y apoyo en la realización de este experimento.

4.8 LITERATURA CITADA

- Chen, J., Devanand, P. S., Norman, D. J., Henny, R. J., & CHAO, C. C. T. (2004). Genetic relationships of *Aglaonema* species and cultivars inferred from AFLP markers. *Annals of Botany*, 93(2), 157-166.
- Chen, L., Zhao, L., Bai, Y., Hu, R., & Si, J. (2009). Genetic relationship analysis of different provenances of *Leonurus japonicus* by ISSR marker. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 34(11), 1343-1345.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In Hewitt G. M., Johnston, A. W. B. & Young J. P. W. (eds.). *Molecular techniques in taxonomy*. Berlin, Springer.
- Gaggiotti, O. E., Chao, A., Peres-Neto, P., Chiu, C. H., Edwards, C., Fortin, M. J. & Selkoe, K. A. (2018). Diversity from genes to ecosystems: A unifying framework to study variation across biological metrics and scales. *Evolutionary applications*, 11(7), 1176-1193.
- Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185.
- Hamada, K., & Hagimori, M. (1996). RAPD-based method for cultivar-identification of calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Scientia Horticulturae*, 65(2-3), 215-218.
- He, S., Yang, Y., Li, Z., Wang, X., Guo, Y., & Wu, H. (2020). Comparative analysis of four *Zantedeschia* chloroplast genomes: expansion and contraction of the IR region, phylogenetic analyses and SSR genetic diversity assessment. *PeerJ Life & Environment*, 8, Article e9132.
- Hotelling, H. (1951). A generalized T test and measure of multivariate dispersion. In *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability* (pp. 23-41). The Regents of the University of California. <https://projecteuclid.org/euclid.bsmsp/1200500217>
- Johnson, E. D. (1998). Discriminant analysis. In E. D. Johnson (Ed.), *Applied Multivariate Methods for data Analysts*. Duxbury Press Brookes/Cole Publishing Company.

- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ Life & Environment*, 8, Article e9391.
- Li X. L. (2011). *Anther culture of Zantedeschia aethiopica and the characterization of regenerated plants* [Master's thesis, Yunnan University].
- Lu, B., Zheng, Y. H., Peng, F., Shu, X. C., & Chen, X. X. (2012). Optimization of RAPD reaction system by uniform design on *Zantedeschia* hybrid. *Northern Horticulture*, 11, 123-126.
- Massawe, F. J., Dickinson, M., Roberts, J. A., & Azam-Ali, S. N. (2002). Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) landraces revealed by AFLP markers. *Genome*, 45(6), 1175-1180.
- Mayes, S., Ho, W. K., Kendabie, P., Chai, H. H., Aliyu, S., Feldman, A. R. Y. O & Azam-Ali, S. A. Y. E. D. (2015). Applying molecular genetics to underutilised species problems and opportunities. *Malaysian Applied Biology*, 44(4), 1-9.
- Medrano-Hernández, J. M., Rodríguez de la O, J. L., Reyes-Trejo, B., & Peña-Ortega, M. G. (2017). Caracterización molecular mediante iniciadores ISSR de *Magnolia mexicana* DC. de dos regiones de Zongolica, Veracruz, México. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(3), 427-436.
- Oumer, O. A., Dagne, K., Feyissa, T., Tesfaye, K., Durai, J., & Hyder, M. Z. (2020). Genetic diversity, population structure, and gene flow analysis of lowland bamboo [*Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro] in Ethiopia. *Ecology and Evolution*, 10(20), 11217-11236.
- Pabendon, M. B., Azrai, M., Kasim, F., & Mejaya, M. J. (2007). Prospek Penggunaan Markah Molekuler dalam Program Pemuliaan Jagung (Dalam Buku : Jagung Teknik Produksi dan Pengembangan). Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Departemen Pertanian. Jakarta.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Pusadee, T., Jamjod, S., Chiang, Y. C., Rerkasem, B., & Schaal, B. A. (2009). Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai

- rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13880-13885.
- Reznik, N., Subedi, B. S., Weizman, S., Friesem, G., Carmi, N., Yedidia, I., & Sharon-Cohen, M. (2021). Use of X-ray mutagenesis to increase genetic diversity of *Zantedeschia aethiopica* for early flowering, improved tolerance to bacterial soft rot, and higher yield. *Agronomy*, 11(12), 2537.
- Sarjani, T. M., Mawardi, M., Pandia, E. S., & Wulandari, D. (2017). Identifikasi morfologi dan anatomi tipe stomata famili Piperaceae di Kota Langsa. *Jurnal IPA & Pembelajaran IPA*, 1(2), 182-191.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.
- Sharma, S. K., Kumaria, S., Tandon, P., & Rao, S. R. (2011). Single primer amplification reaction (SPAR) reveals inter-and intra-specific natural genetic variation in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Gene*, 483(1-2), 54-62.
- Sherwin, W. B. (2018). Entropy, or information, unifies ecology and evolution and beyond. *Entropy*, 20(10), 727.
- Sherwin, W. B., Chao, A., Jost, L., & Smouse, P. E. (2017). Information theory broadens the spectrum of molecular ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(12), 948-963.
- Slaughter, R. J., Beasley, D. M., Lambie, B. S., Wilkins, G. T., & Schep, L. J. (2012). Poisonous plants in New Zealand: a review of those that are most commonly enquired about to the National Poisons Centre. *New Zealand Medical Journal*, 125(1367), 87-118.
- Wei, Z. Z., Luo, L. B., Zhang, H. L., Xiong, M., Wang, X., & Zhou, D. (2012). Identification and characterization of 43 novel polymorphic EST-SSR markers for arum lily, *Zantedeschia aethiopica* (Araceae). *American Journal of Botany*, 99(12), Article e493-e497.
- Wei, Z., Sun, Z., Cui, B., Zhang, Q., Xiong, M., Wang, X., & Zhou, D. (2016). Transcriptome analysis of colored calla lily (*Zantedeschia rehmannii* Engl.)

- by Illumina sequencing: de novo assembly, annotation and EST-SSR marker development. *PeerJ Life & Environment*, 4, Article e2378.
- 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.
- Yao J.L. (1992). *Interspecific hybridisation and molecular characterisation of hybrids in the genus Zantedeschia* [*Ph.D. Thesis*, Massey University]. MU Campus Repository.
https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/3154/02_whole.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Zhang Y.C., Tang G.G., Chu Y.X., Wu A.Z. (2009). Optimization of ISSR reaction system and preliminary study on *Zantedeschia*. *Mol. Plant Breed*, 7, 827–832.
- Zhen, C. H. E. N., Bing-liang, X. U., Chong-jian, P. U., Qiong, X. U., & Gu, T. I. (2013). Physiological and biochemical and resistance changes and ISSR polymorphic analysis exposed to $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion radiation on calla lily. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 27(5), 552.
- Zhu, Z., Zhang, L., Gao, L., Tang, S., Zhao, Y., & Yang, J. (2016). Local habitat condition rather than geographic distance determines the genetic structure of *Tamarix chinensis* populations in Yellow River Delta, China. *Tree Genetics & Genomes*, 12(1), 1-9.