

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Propagación *in vitro* de *Lilium sp.*

Por:

MARÍA GUADALUPE GUTIÉRREZ BOCANEGRA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Propagación *in vitro* de *Lilium* sp.

Por:

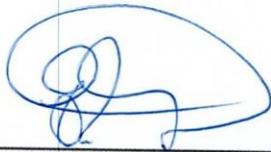
MARÍA GUADALUPE GUTIÉRREZ BOCANEGRA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Elda Barbarita Companioni González
Director Principal Interno



Dr. Rómulo García Velasco
Director Principal Externo



Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Junio, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Propagación *in vitro* de *Lilium sp.*

Por:

MARÍA GUADALUPE GUTIÉRREZ BOCANEGRA

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

Dra. Elda Barbarita Companioni González
Director Principal Interno

Dr. Rómulo García Velasco
Director Principal Externo

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Co-asesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Junio, 2024

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

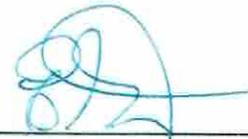
Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

María Guadalupe
Gutiérrez.

María Guadalupe Gutiérrez Bocanegra
Autor Principal



Dra. Elda Barbarita Companioni González
Director Principal Interno

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar esta gran meta en mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además me ha guiado y me ha dado la fortaleza para seguir adelante.

A mi Alma Terra Mater, por brindarme un hogar durante los mejores cinco años, cargó mis maletas llenas de sueños, me alimentó y me formó como profesional y como ser humano; más enamorada de mi universidad no puedo estar. ¡Buitres por siempre!

A mi profesora y asesora; Dra. Elda Barbarita Companioni González. Por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por compartir su conocimiento y amor por la investigación tanto en el aula como en el laboratorio. Le agradezco su apoyo, tiempo y motivación.

A mis padres, gracias por ser mi luz en los momentos más oscuros, por siempre creer en mí, apoyarme, animarme a ser fuerte y valiente; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Cómo les puedo pagar todo lo que hacen por mí.

A mi hermana Isabel, por ser mi amiga incondicional y por estar siempre para mí.

A mi familia; mi abue, tías, tíos, primas y primos; son parte fundamental en mi vida y a pesar de estar a distancia, los siento cerquita. Este logro no es sólo mío.

A mis profesores, por su dedicación a los estudiantes y por todos los conocimientos compartidos. Infinitas gracias.

A mis amigos, las amistades más bonitas, valiosas y sinceras que tengo; **Isa, Mari, Carmencita, Yadhis, Diana, Mariel, Eve, Maye, Jaky** y no menos importante a los **Ing. María Lorena Bárcenas Maya** (la mejor roomie que pude tener), **Jennifer Elizabeth López Morales, Ximena Mata Baeza, Ruth López López, Alex Omar Hernández Maldonado**, por ser mi segunda familia y por brindarme su apoyo incondicional en los momentos difíciles. Los llevo en mi corazón siempre.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme cumplir una meta más en el trayecto de mi vida, por haberme dado sabiduría y las fuerzas necesarias para culminar con éxito.

A mi madre *Ester Bocanegra Carretero*, a mi padre *Ignacio Gutiérrez Paredón* y a mi hermana *María Isabel Gutiérrez Bocanegra* (mi compañera de vida y confidente); ustedes son mi adoración y mi razón de vivir. Por ustedes y para ustedes todo mi esfuerzo y dedicación.

A mi abuelita *Irene Paredón Paredón*, no estuvo en el término de esta etapa tan importante, pero sé que desde el cielo me ve y me cuida siempre. Muchos besos y abrazos con todo mi amor.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN.....	XI
1.0 INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 JUSTIFICACIÓN	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2.0 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Sistemática e importancia del género <i>Lilium</i>	16
2.2 Características botánicas del cultivo.....	18
2.3 Principales enfermedades que afectan en el cultivo <i>Lilium</i>	20
2.4 Propagación sexual y asexual en el cultivo <i>Lilium</i>	26
2.5 <i>Lilium</i> : situación actual en México.....	28
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.0.1 <i>Generalidades de los experimentos</i>	30
3.1 Determinación de las condiciones para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Lilium</i> sp. en la variedad Concador.....	30
3.1.1 <i>Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación e inducción de microbulbos de Lilium in vitro</i>	31
3.2 Determinación de las condiciones para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Lilium</i> a partir de escamas en el medio semi-sólido.....	31
3.2.1 <i>Efecto de la concentración de sacarosa en la multiplicación de microbulbos de Lilium</i>	32
3.2.2 <i>Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente in vitro en la multiplicación de microbulbos de Lilium</i>	33
3.3 Aclimatización de microbulbos de <i>Lilium</i>	33
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Determinación de las condiciones para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Lilium</i> sp. en la variedad Concador.....	35
4.1.1 <i>Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación e inducción de microbulbos de Lilium in vitro</i>	35
4.2 Multiplicación de microbulbos de <i>Lilium</i> a partir de escamas en medio semi-sólido.....	40

4.2.1 Efecto de la concentración de sacarosa en la multiplicación de microbulbos de <i>Lilium</i>.	40
4.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente <i>in vitro</i> en la multiplicación de microbulbos de <i>Lilium</i>.	42
4.3 Aclimatización de microbulbos de <i>Lilium</i>.	47
5.0 CONCLUSIONES	50
6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación por hongo y bacteria, así como la supervivencia.	35
Cuadro 2. Nivel de respuesta de las variedades y el tipo de escama a los 42 días del establecimiento in vitro de escamas de Liliium.	38
Cuadro 3. Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente in vitro en la formación de microbulbos y escamas por microbulbo de Liliium variedad Concador a los 42 días de cultivo.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Botánica del cultivo.....	18
Figura 2. Esquema comercial en el cultivo de Liliium.	26
Figura 3. Porcentaje de pérdidas por hongo y bacteria, así como la supervivencia por tipo de escama, independientemente de la variedad, a los 42 días del establecimiento in vitro.	37
Figura 4. Número de microbulbos por explante que se formaron en cada una de las variedades independientemente del tipo de escama a los 42 días del establecimiento in vitro.	39
Figura 5. Formación de microbulbos a partir de escamas de bulbos ex vitro en medio de cultivo MS + 1.0 BA + 0.3 ANA y 30 g.L ⁻¹ de sacarosa.	40
Figura 6. Efecto de la concentración de sacarosa (60, 80 y 100 g/L) en el número de microbulbos/escama, el número de escamas de cada microbulbo y la masa fresca promedio de las escamas a los 42 días de cultivo.	41
Figura 7. Efecto del BAP, concentración de sacarosa, luz y oscuridad en la formación de microbulbos.....	43
Figura 8. Efecto del ANA, concentración de sacarosa, luz y oscuridad en la formación de microbulbos.....	44
Figura 9. Efecto de la concentración de ANA (0, 0.1, 0.2 y 0.3 mg. L ⁻¹) en el número de microbulbos por escama, la masa fresca de los microbulbos, el número de escamas de cada microbulbo, y la masa fresca de las raíces a los 42 días de cultivo.	45
Figura 10. Esquema que resume el protocolo para el establecimiento y la multiplicación de microbulbos de Liliium en medio semi-sólido.	47
Figura 11. Efecto de biofertilizantes en el desarrollo de microbulbos de Liliium provenientes de la micropropagación en la etapa de aclimatización.....	48
Figura 12. Efecto de biofertilizantes en la masa fresca y en el volumen de microbulbos de Liliium provenientes de la micropropagación en la etapa de aclimatización.	49

RESUMEN

El cultivo de *Lilium* constituye uno de los géneros de bulbos de flor más importantes en el mundo tanto para flor de corte como planta en maceta. El Estado de México constituye el estado con el mayor volumen de producción de flores ornamentales en el país entre las que destacan las rosas, gerbera, *lilium* y girasol. Sin embargo, los productores de *Lilium* para establecer áreas a este cultivo se abastecen de bulbos importados; y mantenidos en cadena de frío hasta su siembra en campo. Lo cual favorece a la aparición de enfermedades que en muchos casos no son detectadas al momento de ser adquiridas por el productor. La investigación recogida en la presente tesis se logró un protocolo para la propagación *in vitro* de *Lilium* en la variedad Concador. Se observó la mayor eficiencia en el establecimiento *in vitro* de *Lilium* mediante la implantación de las escamas internas del bulbo donante. Donde se observaron los menores valores en contaminación; mayor supervivencia y mayor respuesta en la formación de microbulbos. Las mejores condiciones para la multiplicación de microbulbos de *Lilium* se lograron en condiciones de oscuridad, pero con el uso de 0.2 mg. L⁻¹ de ANA y 80 g. L⁻¹ de sacarosa. La aclimatización de los microbulbos de *Lilium* en sustrato de *peat moss* + termolita; y con la aplicación de biofertilizantes mostró los mejores resultados en la masa fresca y volumen del microbulbo con marcadas diferencias respecto al resto de los tratamientos.

Palabras clave: propagación *in vitro*, *Liliáceas*, ornamentales, aclimatización, biotecnología vegetal.

1.0 INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Lilium* constituye uno de los géneros de bulbos de flor más importantes en el mundo tanto para flor de corte como planta en maceta. En los últimos años ha adquirido gran importancia en los mercados nacionales e internacionales. Dado a la diversidad de cultivares y a la calidad de los bulbos que el mercado ofrece, a su belleza, al alto precio de sus varas florales; y a la posibilidad de producción durante todo el año (Gómez, 2010; SAGARPA, 2018).

México es un país que posee un fuerte potencial de producción de cultivos ornamentales. En este sentido, el Estado de México concentra el 90% de la producción florícola; y es el único estado en el país con capacidad de exportación, en los cuales Estados Unidos y Canadá constituyen sus principales mercados (SAGARPA, 2018). En relación al 2020, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) informaron el aumento en la producción de seis de las especies ornamentales más populares en México en las que se encontraron: rosa, gerbera, *Lilium* y girasol. En particular en el cultivo de *Lilium* se logró un aumento de 3.6% (762 mil 155 gruesas). El 84.5% de la producción se registró en el Estado de México; y el 13.6% en el estado de Veracruz. Lo cual posicionó en el 2021 al Estado de México como la entidad con el mayor volumen de producción de flores ornamentales en el país, con una participación del 75.7% del total nacional. Al sumar 20 millones 454 mil 780 gruesas con valor de cuatro mil 749 millones de pesos. Lo cual equivale al 74.3% nacional. Los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo, Amanalco y Valle de Bravo son los municipios mexiquenses donde se produce la mayor parte de especies ornamentales (SADER, 2022). Sin embargo, los productores de *Lilium* para establecer áreas a este cultivo se abastecen de bulbos importados; y mantenidos en cadena de frío hasta su siembra en campo. Aspecto que favorece la aparición de enfermedades fungosas y bacterianas, que en muchos casos no son detectadas al momento de ser adquiridas por el productor (Streck y Schuh, 2005). Por otra parte, este bulbo sembrado produce flores de calidad de exportación sólo en la primera cosecha. Por tanto, el productor de *Lilium* debe comprar

nuevamente bulbos para poder mantener sus programas de siembra durante todo el año. Aspectos que incrementan los costos de producción y disminuye la rentabilidad del cultivo (Orlando *et al.* 2009; Juárez, 2010). Por lo que constituye una prioridad buscar alternativas con el fin de darle solución al problema existente. Por lo tanto, la aplicación de la Biotecnología Vegetal en el campo de la propagación de plantas resulta una herramienta básica y efectiva para obtener bulbos de mayor calidad (no contaminados) para plantar durante todo el año sin necesidad de importarlo. Las técnicas del cultivo *in vitro* han sido utilizadas desde 1972 para la multiplicación acelerada de diferentes cultivos de interés. Los bulbos producidos *in vitro* tienen propiedades favorables y se consideran un propágulo excelente. Entre sus atributos tenemos su fácil manipulación, transporte, almacenaje; y libres de patógenos siempre que se inician a partir de material sano (Thakur *et al.*, 2002). Varios autores han descrito diferentes métodos de propagación *in vitro* utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en *Lilium* (Thakur *et al.*, 2005; Kapoor *et al.*, 2006; Castro y Londoño, 2008; Pandey y Sharma, 2009).

Basado en los planteamientos anteriores, la investigación recogida en el presente documento de tesis estuvo encaminado a la comprobación de la siguiente hipótesis: La propagación *in vitro* de *Lilium* puede ser utilizada para la obtención de microbulbos como material sano para la siembra a productores florícolas en el cultivo.

1.1 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de *Lilium* en los últimos años ha adquirido gran importancia en los mercados nacionales e internacionales. Sin embargo, en México los productores de *Lilium* para establecer áreas a este cultivo se abastecen de bulbos importados; y mantenidos en cadena de frío hasta su siembra en campo. Este bulbo sembrado produce flores de calidad de exportación sólo en la primera cosecha. El bulbo que queda después del corte de la flor produce flores de baja calidad; y por lo general se desecha. Por tanto, el productor de *Lilium* debe comprar nuevamente bulbos para poder mantener sus programas de siembra durante todo el año. Aspecto que incrementa los costos de producción, y disminuye la rentabilidad del cultivo. Por estas razones, se hace necesario el desarrollo de técnicas *in vitro* que permitan lograr con mayor rapidez y eficiencia la comercialización de bulbos de *Lilium* en la región, y en todo el país.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener un protocolo para la propagación *in vitro* de *Lilium* sp. en la variedad Concador.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones para el establecimiento *in vitro* de *Lilium* sp. en la variedad Concador.
- Determinar las condiciones para la multiplicación *in vitro* de *Lilium* a partir de escamas en medio semi-sólido.
- Lograr la aclimatización de microbulbos de *Lilium*.

2.0 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemática e importancia del género *Lilium*.

La flor de Lili (*Lilium*) conocida comúnmente como flor de lis, azucena o lirio es un género de herbáceas bulbosas perteneciente a la familia de las *Liliáceas*. La cual es originaria de las zonas templadas de Eurasia y América (SAGARPA 2018). De acuerdo a Facchinetti y Marinangeli (2008) el *Lilium* sp. pertenece a la siguiente clasificación taxonómica:

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Lilidae*

Orden: *Liliales*

Familia: *Liliaceae*

Subfamilia: *Lilioideae*

Género: *Lilium*

Especie: *Lilium*

Existe alrededor de 100 especies, una gran parte de ellas se cultiva como flor de corte. Son plantas herbáceas perennes, originarias del hemisferio norte. Las flores representan el objeto técnico de selección e hibridación de las distintas especies que han mejorado el género de cultivos de azucenas, con una variación de colores casi infinita (Facchinetti y Marinangeli, 2008). El cultivo de *Lilium* es uno de los géneros de bulbos de flor de mayor importancia en el mundo. Lo anterior se atribuye a su diversidad de colores logrado a través de la hibridación entre especies asiáticas y orientales; y la disponibilidad de la flor durante todo el año mediante los sistemas intensivos de producción (Sánchez *et al.*, 2008; Gómez, 2010). A nivel internacional, Holanda produce cada año decenas de millones de bulbos de tamaño adecuado. Actualmente, posee el monopolio de la producción de bulbos de *Lilium* para sus diferentes usos (flor cortada, planta en maceta o en jardinería). Las empresas holandesas propietarias de los derechos de obtentor envían material de reproducción a Chile con el propósito de engordarlos para lograr bulbos de calibres comerciales (diámetro

10 a 20 cm). Posterior a ello, desde Chile se exportan los bulbos a Estados Unidos y a Holanda (Facchinetti y Marinangeli, 2008).

2.2 Características botánicas del cultivo.

Los *Lilium* presentan bulbos compuestos por brácteas escamosas constituido por hojas modificadas que se agrupan en torno a un disco basal. Estas hojas modificadas son escamas carnosas que protegen a un meristemo apical que da origen a un tallo folioso no ramificado de crecimiento definido. El meristemo apical toma alimento de las escamas carnosas, así como de las raíces que nacen del disco basal y raíces adventicias ubicadas inmediatamente en la porción superior del bulbo. Estas últimas son importantes para la absorción del agua y los nutrientes (Herrerros, 1983). En el extremo caulinar se desarrollan las flores, solitarias o en inflorescencias racimosas. En la figura 1 se muestra la botánica del cultivo según Hertogh y Le Nard (1993) descrito con anterioridad.

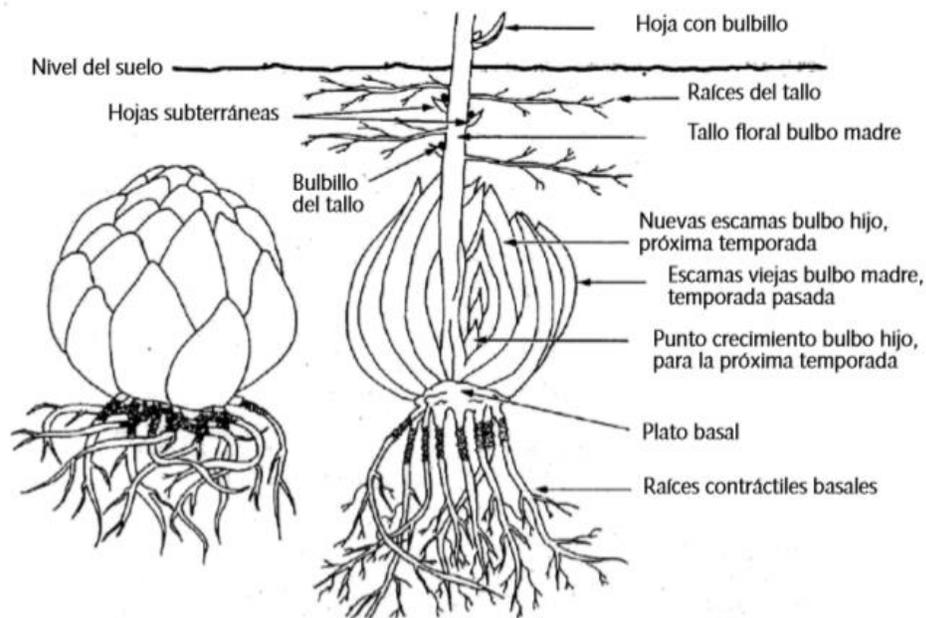


Figura 1. Botánica del cultivo (Hertogh y Le Nard, 1993).

De manera tradicional, los *Lilium* se han clasificado en híbridos asiáticos, orientales y *Longiflorum*. La hibridación interespecífica ha permitido el desarrollo de nuevos grupos de *Lilium*, los cuales exhiben características mejoradas. La demanda del *Lilium* asiático disminuyó a excepción de algunos cultivares y este fue sustituido por los híbridos de LA (*Lilium longiflorum* x *Lilium* asiático). Los híbridos LA presentan flores más grandes y se

encuentran disponibles en una amplia variedad de colores; pero no tienen aroma. Mientras, los híbridos asiáticos son conocidos por su amplia variedad de colores. Por lo general, su floración es intensa y presentan menor calibre del bulbo en comparación con los híbridos orientales. Por otra parte, las flores de los híbridos asiáticos son más pequeñas y menos exóticas en comparación con los otros dos grupos y algunos de sus cultivares son más propensos a sufrir quemaduras en las hojas (AVB, 2016). Los híbridos orientales producen flores grandes con formas exóticas, poseen un aroma más intenso y necesitan menos luz. Pero, tardan más en reproducirse. Por otro lado, presentan menos variación de color y son susceptibles de sufrir varias enfermedades. Los híbridos OT (*Lilium* oriental x *Lilium* de trompeta) producen flores grandes y brindan una amplia gama de variedades de colores que incluyen amarillo y salmón. Además, los híbridos OT son más adecuados para un largo almacenamiento; y son menos susceptibles a las enfermedades. Los híbridos *Longiflorum* se distinguen por sus grandes flores con forma de cáliz, y por lo general de color blanco. Entre sus características menos positivas es la limitada gama de colores y su alta sensibilidad a los virus (AVB, 2016). Después de años de actividades en el cultivo dirigidas a cada uno de estos grupos resulta imposible realizar mayores mejoras en el cultivo. Sin embargo, las nuevas técnicas de cultivo hacen posible cruzar híbridos de un grupo con híbridos de otro grupo. Con el objetivo de combinar las características positivas típicas de los diferentes grupos tales como: la resistencia a las enfermedades. El desarrollo en el mejoramiento genético del cultivo ha permitido el desarrollo de nuevos grupos dentro de la gama de *Lilium*. Cada uno con nuevas formas, colores y mejoras en varios aspectos. Su evolución fue necesaria para mantener el interés de los productores en el cultivo; y aún más importante, para que su demanda fuera en aumento (AVB, 2016). A continuación, se desglosan los grupos de híbridos que se consideran estándar dentro de la gama de *Lilium*; y el año en que se logró el éxito del primer híbrido:

1. Híbridos LA: cruce entre híbridos *Longiflorum* y asiáticos (1970)
2. Híbridos OT: cruce entre híbridos orientales y trompeta (1980)
3. Híbridos LO: cruce entre híbridos *Longiflorum* y orientales (1990)
4. Híbridos OA: cruce entre híbridos orientales y asiáticos (1995)

2.3 Principales enfermedades que afectan en el cultivo *Lilium*.

En la actualidad, los productores de *Lilium* afrontan varios problemas fitosanitarios en el cultivo donde el propágulo constituye la principal fuente de inóculo de los patógenos causando enfermedades en el cultivo. Las cuales pueden influir en el crecimiento, el rendimiento y el valor ornamental de los lirios (Conijn, 2014). Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan la producción en el cultivo encontramos: virus, bacterias y hongos. Seguido, se describen de manera breve su incidencia en el cultivo en condiciones de campo:

Enfermedades por virus

Virus asintomático del lirio (LSV): El virus es causado por áfidos y trips dentro de un área limitada, lo que se conoce como transmisión no persistente. Los áfidos más comunes son el *Aphis gossypii* y *Myzus nicotianae*. Se localizan en el segmento apical de la planta y pueden provocar deformaciones en las hojas y en los botones florales. Los trips son insectos que se presentan por lo general en la inflorescencia, y de esta manera afecta de forma directa la calidad de las flores. El principal es *Frankliniella occidentalis* que causa picaduras y provocan manchas, deformaciones en los botones florales y acortamiento de entrenudos en las plantas (Morales y Arbeláez, 2015; AVB, 2016).

Virus del mosaico del lirio (LMOV): Un patrón moteado consiste en una luz ligeramente contorneada, manchas y rayas de color verde oscuro en las hojas. Algunas variedades pueden presentar curvatura y estrechamiento de las hojas. En el tallo pueden aparecer manchas necróticas de color café. Por otra parte, durante una propagación masiva del virus se puede observar un rápido amarillamiento de las hojas en la parte media y superior de la planta durante las primeras semanas. Esta coloración puede cambiar a color púrpura o marrón. Este virus se transmite por áfidos dentro de un área limitada o mejor conocida como transmisión no persistente (AVB, 2016; Xu y Ming, 2022).

Virus del mosaico del pepino (CMV): Sus síntomas son similares a los del virus del mosaico del lirio. Los cuales consisten en puntos bien definidos de color verde claro y rayas en toda la hoja generalmente curvadas. Los primeros síntomas se desarrollan en la parte superior

de la planta; y se extiende a las hojas subyacentes. Una planta infectada con este virus no necesariamente presenta síntomas y con frecuencia puede ocurrir sin ningún signo de síntomas. CMV se transmite por áfidos por medio de la transmisión no persistente (AVB, 2016).

Virus del mosaico del plántago asiático (PIAMV): Este virus puede producir síntomas graves en los lirios. Una planta infectada presenta hojas onduladas, con venas de forma irregular que causa las hojas de diferente forma. Por otro lado, pueden evidenciar manchas grises. Aunque esta coloración puede cambiar a color marrón más tarde. La expresión de los síntomas depende de la variedad y de las condiciones del cultivo. PIAMV puede tener un impacto importante en híbridos LA, a excepción de unos pocos cultivares; y en mayor medida en los híbridos orientales, específicamente en OT. Los síntomas se presentan normalmente bajo fuertes fluctuaciones de temperatura o bajo condiciones de cultivo pobres y si el bulbo está infectado no sólo de PIAMV sino también de otros virus, será más propenso a mostrar síntomas (AVB, 2016).

Enfermedades bacterianas

Erwinia spp.: La enfermedad conocida como pudrición blanda del bulbo y tallo es causada por la bacteria *Erwinia spp.* (Magos-García *et al.*, 2010). La cual puede provocar pérdidas del 50% de la producción. Los primeros síntomas se observan en las escamas, en forma de manchas traslucidas cuando comienza la infección y a medida que la enfermedad avanza se extiende por todo el bulbo. Lo cual ocasiona la pudrición blanda. Se puede detectar en las heridas de las escamas debido a la podredumbre y el olor fétido que produce. Por otro lado, durante la producción en campo los tallos infectados por esta bacteria presentan poco desarrollo y baja formación de botones florales (Smadja *et al.*, 2004; Vann Door *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2014).

Enfermedades fúngicas

Fusarium oxysporum: La pudrición de bulbos, escamas y manchado de tallo es causada principalmente por *Fusarium oxysporum*. La cual se considera como una de las enfermedades más destructivas en los últimos años en el cultivo. La enfermedad

proveniente del material propagativo infestado. Los síntomas se manifiestan generalmente cuando las plantas están próximas a la floración. Este hongo penetra en el bulbo por medio de heridas; y se manifiesta en manchas de color café oscuro en las escamas y bulbos con posterior pudrición de los tejidos. En los bulbos se produce un amarillamiento de las hojas basales, en sentido ascendente con respecto al tallo, al cual quedan adheridas y finalmente se pudren cuando la infección de las escamas alcanza la base de éste (García, 2002; Streck y Schuh, 2005; Van Door *et al.*, 2011).

Botrytis elliptica: El moho gris causado por el hongo patógeno necrotrófico *Botrytis elliptica* provoca la muerte descendente de las ramas, necrosis total de las hojas banderas; y una defoliación total de la planta. Por otra parte, puede afectar en cualquier estado de desarrollo incluso en post-cosecha. En las hojas los síntomas provocados por este hongo patógeno son manchas marrones grisáceas y marrones oscuras. En ambos lados de las hojas se pueden observar estas manchas descritas con anterioridad. Si las hojas están gravemente infestadas, el tejido puede marchitarse volverse amarillo, arrugarse y secarse. El tejido necrótico produce grandes cantidades de esporas que se dispersan con facilidad al menor contacto o por las gotitas de agua y en las condiciones adecuadas, el hongo se extenderá rápidamente. En los tallos, *Botrytis* provoca que la capa exterior de los tallos se vuelva verde grisáceo o marrón oscura. Los botones florales también pueden verse infestados. Los botones infestados en una etapa temprana del desarrollo presentan manchas marrones en los pétalos exteriores y a medida que se desarrollan, sufren malformaciones y se pudren. Las flores que se han abierto se pueden ver con una apariencia grisácea, acuosa y con manchas redondas. Dentro de los tipos de *Lilium*, los híbridos asiáticos y *longiflorum* son más vulnerables que los híbridos orientales. Dentro del grupo de los híbridos asiáticos, los cultivares de colores blancos y rosados son los más vulnerables (Leyva-Mir *et al.*, 2009; AVB, 2016).

Pythium: Este hongo provoca pudrición de raíces, tanto en el bulbo como en el tallo de las plantas bulbosas ornamentales. Por otro lado, puede producir manchas de tonalidad marrón debido a la putrefacción, amarillez y marchitez foliar. En general este patógeno produce desecación del capullo floral, disminución en el crecimiento de las plantas e incluso muerte

prematura (Seemann y Andrade, 1999). Cuando las plantas están colonizadas por este patógeno, éste se encuentra disperso por todo el cultivo o por la zona del cultivo. Las hojas inferiores se vuelven amarillas y las hojas superiores son más estrechas y se marchitan durante los periodos de fuerte transpiración. Las plantas se desarrollan mal, son cortas. Por lo tanto, las flores suelen ser pequeñas. Además, las flores no pueden abrirse del todo y no llegan a alcanzar los colores adecuados. Por lo general, estos hongos patogénicos se desarrollan en ambientes húmedos y crecen mejor entre 20-30°C. El patógeno permanecerá en el suelo, así como en las raíces del bulbo y en el interior del mismo (AVB, 2016).

Phytophthora: Es el agente causal del retraso en el crecimiento y marchitez repentina. La base del tallo presenta pudrición húmeda y un color verde oscuro o marrón oscuro. La pudrición se extiende hacia las partes superficiales de la planta lo cual provoca que se doblen o se caigan. Esta enfermedad es causada por hongos del género *Phytophthora*. El más común es *Phytophthora nicotianae*. El hongo se extiende mediante zoosporas que se distribuyen a través de partículas del suelo y salpicaduras de agua (Seemann y Andrade, 1999; AVB, 2016).

Penicillium: El patógeno se desarrolla durante el almacenamiento del bulbo, y causa pudrición de color marrón en las escamas del bulbo. La pudrición se extiende durante el periodo de almacenamiento, incluso a bajas temperaturas (-2°C). Después de un periodo de tiempo, el hongo puede penetrar en la base y desde ahí penetrar en otras escamas y a su vez, estas escamas se separarán de la base y dejarán de contribuir al crecimiento de la planta. Aunque los bulbos sólo están ligeramente infectados, la apariencia no es buena. Los hongos *Penicillium* por lo general se encuentran en el medio ambiente y comienza durante el almacenamiento cuando las esporas hieren el tejido del bulbo. Una temperatura excesivamente alta y una humedad relativa demasiado baja durante el almacenamiento favorecen este problema (Conijn, 2014; AVB, 2016).

Rhizoctonia solani: El daño producido por *Rhizoctonia solani* se limitará a las hojas en el suelo y a las hojas verdes más bajas del nuevo brote. Las hojas presentarán manchas de

color marrón pálido. Las plantas pueden florecer normalmente, pero con puntas de hojas dañadas. En general, el desarrollo de la planta será algo más lento, pero continuará creciendo. Si la infección es grave, las plantas crecerán con retraso y tanto las hojas blancas subterráneas como las hojas más bajas de la superficie se pudrirán o marchitarán. Se detiene la aparición de raíces del tallo, el desarrollo se retrasa y la floración es pobre o inexistente (Morales y Arbélez, 2015; AVB, 2016).

En relación a la problemática de las enfermedades en el cultivo, Streck y Schuh (2005) y Van Door *et al.*, (2011) plantearon que se requiere de mayor atención por parte de los programas de sanidad vegetal en detectar estas infecciones en los bulbos almacenados (propágulos); antes de llevar a campo para evitar pérdidas en las plantaciones en campo. Por otra parte, se hace necesario el desarrollo de técnicas de propagación que permitan la obtención de bulbos de mayor calidad (libre de patógenos) en menor tiempo y a más bajos costos. Lo cual permitiría una mayor rapidez y eficiencia; tanto en la reproducción como en la comercialización de bulbos de *Lilium* en todo el país. De esta manera se evitaría la importación de material vegetativo contaminado (García y Companioni, 2018). Por otro lado, la disponibilidad de este cultivo es durante todo el año mediante los sistemas intensivos de producción (Álvarez *et al.*, 2008). Sin embargo, para el control de los problemas fitosanitarios se han implementado alternativas químicas que no erradican por completo, sólo logran reducir las tasas de crecimiento de estos patógeno. Aunque, no se tienen en cuenta las consecuencias del uso descontrolado de fertilizantes o plaguicidas de naturaleza química que afectan directamente en el suelo, agua, aire; y en la salud tanto del productor como del consumidor (Ortega *et al.*, 2006). Por lo tanto, es importante la implementación de programas de control de patógenos mediante alternativas amigables con el medio ambiente. Las cuales permiten reducir los costos de producción además que son una alternativa para evitar la inducción de resistencia en los patógenos (Bhromsiri y Bhromsiri, 2010; Keng *et al.*, 2010;). Como es el caso del uso de extractos vegetales, aceites esenciales, extractos orgánicos y enzimáticos que favorecen al biocontrol de patógenos en la agricultura. Existen diferentes resultados científicos que han demostrado efectividad contra el crecimiento de bacterias, nematodos y hongos fitopatógenos en una amplia

diversidad de cultivos; que facilita el aprovechamiento de los recursos naturales con una reducción en el uso de insumos no agrícolas (Vinueza *et al.*, 2006; Chávez y Aquino, 2012; Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, aún falta la difusión de esta información al floricultor a través de la capacitación e investigación participativa entre técnicos y profesionales de instituciones interesadas a favor de promover nuevas soluciones en el desarrollo del sector productivo florícola en el cultivo de *Lilium* (García y Companioni, 2018). Otra de las problemáticas que enfrentan los productores de *Lilium* en México es el incremento de los costos de producción y la rentabilidad en el cultivo por la carencia de material vegetal de plantación (propágulos). Los productores se abastecen de bulbos importados para poder mantener sus programas de siembra durante todo el año (Streck y Schuh, 2005). Entonces es importante buscar alternativas con el fin de darle solución a este problema. Por lo tanto, la aplicación de la Biotecnología Vegetal en el campo de la propagación de plantas resulta una herramienta básica y efectiva que permite obtener en corto período de tiempo grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria.

Los métodos de micropropagación es una excelente alternativa para satisfacer la demanda de plantación de diferentes especies vegetales (Akin-Idowu *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2012).

2.4 Propagación sexual y asexual en el cultivo *Lilium*.

El *Lilium* se puede propagar mediante dos principales vías de propagación: vía sexual y asexual. La propagación por semillas es un método que se utiliza en el mejoramiento genético en el cultivo. El método natural de propagación vegetativa es a través de bulbos, bulbillos de las hojas, bulbillos del tallo y escamas de bulbos de *Lilium*. La propagación tradicional consiste en la producción de pequeños bulbos en el suelo, en la base del tallo. Los cuales se forman durante el periodo de crecimiento. Por otro lado, produce raíces contráctiles y pequeñas hojas iniciales antes que el tallo original alcance la senescencia (Salinger, 1991). El proceso suele ser tardado que parte de un bulbillo y depende del diámetro o tamaño que se desee alcanzar en la variedad. Pero, por lo regular el proceso dura entre año y medio; y tres años. La influencia del clima también es importante, si es en condiciones naturales o protegidas entre otros factores. Por otro lado, a mayor tamaño de bulbo se obtienen mayores flores por tallo. Los menores tamaños son de menor precio y de menor calidad (Bañón *et al.*, 1993). En la figura 2 se muestra un esquema comercial en el cultivo de *Lilium* según (Gross *et al.*, 2002).

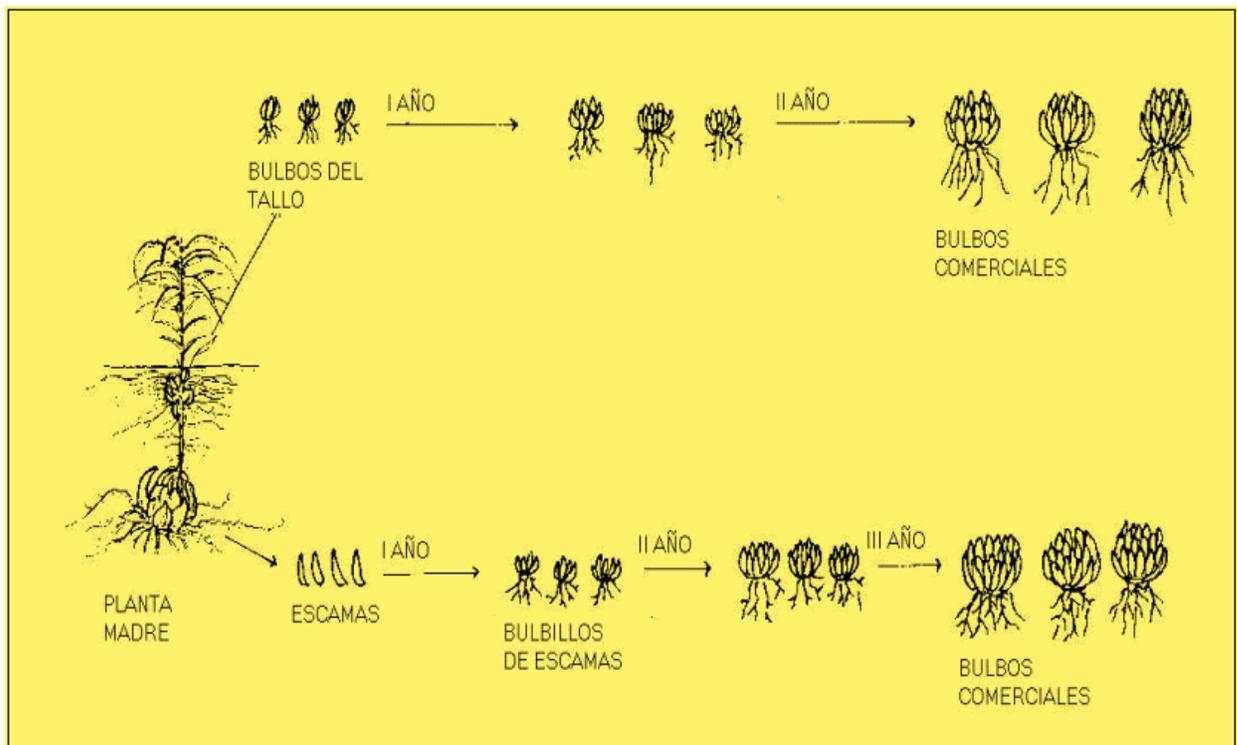


Figura 2. Esquema comercial en el cultivo de *Lilium* (Gross *et al.*, 2002).

Por otra parte, el *Lilium* se puede multiplicar por tejidos o meristemas. Estas técnicas propias de la biotecnología vegetal ofrecen grandes ventajas respecto a los métodos convencionales de propagación en el cultivo de *Lilium* (Herrerros, 1983; Salisbury y Jensen, 1988). Este último método de propagación representa el método más ampliamente utilizado en los países comerciales de bulbos de *Lilium* (Thakur *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2009). Las técnicas de cultivo de tejidos se han utilizado para el mejoramiento genético; y la propagación de *Lilium* (Stimart y Ascher, 1978; Pelkonen, 2005). En general los tejidos de *Lilium* tienen un alto potencial de regeneración (George, 1996). En particular las escamas de los bulbos tienen la mejor capacidad para inducir la formación de bulbos adventicios (Nhut, 1998; Castro *et al.*, 2008; Saifullah *et al.*, 2010; Mir *et al.*, 2012).

Castro y Londoño (2008) desarrollaron un método eficiente para la propagación de *Lilium* sp. mediante escamas de bulbo como explantes del híbrido "Casablanca". Para ello, las escamas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.5%) durante 15 minutos y peróxido de hidrógeno (0.03%) durante dos minutos. Se establecieron en medio de cultivo compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962); y suplementado con benciladenina (0.05 mg.L⁻¹). Para la inducción y diferenciación de microbulbos, el ácido naftalenacético (ANA) (0.1 mg.L⁻¹) fue la concentración que mostró los mejores resultados en cuanto al porcentaje de explantes diferenciados; y el número de microbulbos formados por explante. Sin embargo, en la fase de proliferación se utilizó la kinetina (1.0 mg.L⁻¹) más la adición de sacarosa (60 g.L⁻¹) como fuente carbonada que presentó el mayor número de bulbos (3.9) con un 75% de explantes diferenciados. Por último, después de 45 días en la etapa de multiplicación *in vitro* se formó el primer microbulbo. Mientras que Iturbide *et al.* (2017) establecieron una metodología para la regeneración de plántulas a partir del establecimiento de ápices meristemáticos *in vitro* y la obtención de microbulbos para su multiplicación *in vitro*. Para ello estudiaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para la desinfección de los explantes (0.5%; 1% y 2,0% (v/v)) durante 15 minutos. En la etapa del establecimiento *in vitro* utilizaron ápices meristemáticos que se incubaron en el medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) y sacarosa (30 g.L⁻¹) complementado con diferentes concentraciones de 6-BAP (0.1; 0.2; 0.3; 1.0 mg.L⁻¹). Para

el enraizamiento utilizaron el medio de cultivo anteriormente mencionado al 50% y 100% de las sales. Además de la adición de ANA (0.5 mg.L⁻¹) como una variante del medio que contenía el 50% del medio de cultivo descrito. Los resultados en la investigación lograron el establecimiento *in vitro* del cultivo, seguido de la obtención de microbulbos. Los cuales se realizaron la multiplicación *in vitro* en el medio que contenía 1.0 mg.L⁻¹ de BAP en donde se obtuvieron los mejores resultados. El medio de cultivo constituido por el 50% de las sales de MS y suplementado con ANA fue donde se obtuvieron los mejores resultados en el número de raíces. En la metodología descritas se logró un 98% de sobrevivencia en la etapa de aclimatización.

2.5 *Lilium*: situación actual en México.

El sector florícola posee una de las industrias más fuertes en diversos países desarrollados y en vías de desarrollo. En el cual el cultivo de *Lilium* es uno de los géneros de bulbos de flor de mayor relevancia en el mundo. Ocupa el décimo primer lugar en demanda; y el segundo lugar en plantas bulbosas en México (Procolombia, 2015). Esto se atribuye a la gran diversidad de colores que se logra a través de la hibridación entre especies asiáticas y orientales. Holanda es el principal productor y exportador mundial de bulbos de *Lilium* para sus diferentes usos (flor cortada o planta en maceta). Los bulbos para producción de flor de corte y de plantas en maceta son importados casi exclusivamente de Holanda y en menor medida de Chile (Facchinetti y Marinangeli, 2008; Gómez, 2010). En el caso de México, constituye un país que posee un fuerte potencial de producción de cultivos ornamentales. En este sentido, el Estado de México concentra el 90% de la producción florícola; y es el único estado en el país con capacidad de exportación, siendo Estados Unidos y Canadá sus principales mercados (SAGARPA, 2018). En relación al 2020, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) informaron el aumento en la producción de seis de las especies ornamentales más populares en México las cuales fueron: rosa, gerbera, *Lilium* y girasol. No obstante, México escasea de bulbos para siembra por ello, los productores se abastecen de bulbos importados; los cuales son almacenados en cadena de frío hasta su siembra en campo. Por lo que esto favorece la

aparición de enfermedades por hongos y bacterias que en la mayoría de casos no son detectadas al momento de adquirirlas por el productor. Por otra parte, los bulbos sembrados producen flores de calidad sólo en la primera cosecha, esto provoca que el productor debe comprar nuevamente bulbos para mantener sus programas de siembra durante todo el año, todo esto incrementan los costos de producción y disminuye la rentabilidad del cultivo (Streck y Schuh, 2005). Por todo lo anterior, se visualiza que mediante la propagación masiva de bulbos de *Lilium* se pueden obtener bulbos de mayor calidad en menor período de tiempo y a más bajos costos, lo cual constituye uno de los propósitos más actuales en la aplicación de esta técnica con fines comerciales; y proveerles a los productores material vegetal de bulbos de *Lilium* para lograr sus programas de siembra durante todo el año, a menor costo de producción. Lo anterior sería un gran aporte a la Biotecnología Vegetal en el campo de floricultura en México.

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.0.1 Generalidades de los experimentos.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación de Plantas, del Instituto Mexicano del Maíz "Mario E. Castro Gil", en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

Como material vegetal se utilizaron bulbos sanos de *Lilium* sp. Estos materiales se almacenaron durante dos meses a 4 °C, con la finalidad de superar la dormancia del material vegetal. El medio de cultivo basal fue compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) (sales MS) suplementadas con tiamina (1.0 mg.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), cisteína (25.0 mg.L⁻¹) y sacarosa (20 g.L⁻¹). Para la gelificación del medio de cultivo se utilizó Agar *Phytage*™ (Sigma-Aldrich) a razón de 3.5 g.L⁻¹. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ±1.

Análisis estadístico: En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versión 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997)*.

3.1 Determinación de las condiciones para el establecimiento in vitro de *Lilium* sp. en la variedad Concador.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación de Plantas, del Instituto Mexicano del Maíz "Dr. Mario E. Castro Gil"; perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

Material vegetal: Para la toma de explantes se utilizaron bulbos sanos de *Lilium* sp. de la variedad 'Concador'. Estos materiales se almacenaron durante dos meses a 4 °C, con la finalidad de superar la dormancia del material vegetal.

Condiciones de cultivo: Las condiciones de cultivo en toda la experimentación fueron en una cámara de cultivo en condiciones de oscuridad, con una temperatura de 22 ± 2 °C.

3.1.1 Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación e inducción de microbulbos de *Lilium in vitro*.

Las escamas para su desinfección previamente se clasificaron en escamas externas, medias e internas del bulbo madre. Estas fueron lavadas con abundante agua corriente para eliminar los restos de suelo. Posterior a ello se lavaron con agua y detergente. Seguido se enjuagaron para eliminar el detergente; y una vez en la cabina de flujo laminar se procedió de la siguiente manera: se introdujeron 5 minutos en alcohol al 70%; y después 7 minutos en una solución de bicloruro de mercurio al 0.1%. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en agua destilada estéril para eliminar los restos del desinfectante; y las escamas se colocaron en una placa de petri con papel de filtro estéril bajo el aire del flujo laminar para eliminar la humedad antes de realizar los cortes y proceder a su introducción *in vitro*. Para el establecimiento *in vitro*, todas las escamas se les realizaron cortes en la zona distal y proximal; y algunas punteaduras en la zona media. Las escamas externas por su tamaño se seccionaron en dos o tres segmentos de 1 cm aproximadamente. Las escamas y los segmentos se colocaron en el medio de cultivo en posición adaxial. El medio de cultivo que se utilizó fue el Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 1.0 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) + 0.3 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA); y 30 g.L⁻¹ de sacarosa como fuente carbonada.

Los explantes establecidos se incubaron en el cuarto de cultivo en condiciones de luz (25 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$) durante 45 días. Después de este tiempo se determinaron los niveles de contaminación por hongo y bacteria. Así como el nivel de supervivencia a los 30 días de implantación de los explantes en el medio de cultivo descrito. A los 42 días los microbulbos formados pasaron a la etapa de multiplicación *in vitro* (MS + sacarosa 80g.L⁻¹ + 0.3 mg.L⁻¹ ANA).

3.2 Determinación de las condiciones para la multiplicación *in vitro* de *Lilium* a partir de escamas en el medio semi-sólido.

En este acápite se desarrollaron un conjunto de experimentos con el objetivo de optimizar

la etapa de multiplicación de microbulbos en medio semi-sólido. Para ello se seleccionó la variedad Concador. Donde las escamas internas de los bulbos una vez desinfectadas se le realizan cortes en la zona proximal y distal. Así como punteaduras en la porción media de la escama. Las mismas se colocan en posición adaxial en el medio de cultivo MS + 1.0 mg.L⁻¹ de BAP + 0.3 mg.L⁻¹ de ANA; y 30 g.L⁻¹ de sacarosa, en condiciones de luz por 42 días. Los microbulbos formados se separaron de la escama y se colocaron en medio de multiplicación (MS + 0.2 mg.L⁻¹ de ANA + 80 g.L⁻¹ de sacarosa) en condiciones de oscuridad durante 42 días del cultivo en la etapa de multiplicación *in vitro*. Los microbulbos formados se les eliminaron las raíces; pero las escamas se individualizaron. Por otra parte, se les realizó un corte en la zona distal y se colocaron en un medio de cultivo fresco de multiplicación *in vitro* para la formación de nuevos microbulbos. Con el objetivo de lograr microbulbos de mayor calidad se recomienda utilizar solo las escamas de mayor tamaño de los microbulbos (aproximadamente 2-4 escamas). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: frascos de cultivo Gerber de 90 ml de capacidad con 25 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo semisólido compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962). Para la gelificación del medio de cultivo se utilizó Agar *Phytigel*TM (Sigma-Aldrich) a razón de 3.5 g.L⁻¹. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ±1. En esta etapa todos los experimentos se desarrollaron en condiciones de oscuridad. La duración de la etapa de multiplicación *in vitro* en el cultivo fue de 42 días.

3.2.1 Efecto de la concentración de sacarosa en la multiplicación de microbulbos de *Lilium*.

Las escamas de los microbulbos provenientes de la multiplicación *in vitro* descrita en el acápite anterior se separaron y se les realizó un corte en la porción distal. Posterior a ello se colocaron en el medio de cultivo en posición adaxial. El medio de cultivo fue el MS suplementado con 0.3 mg.L⁻¹ ANA. Se ensayaron tres concentraciones de sacarosa: 60, 80 y 100 g.L⁻¹. Se evaluaron los siguientes parámetros: número de microbulbos por escamas, número de escamas de cada microbulbo, y la masa fresca de las escamas.

3.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente *in vitro* en la multiplicación de microbulbos de *Lilium*.

En la formación de microbulbos a partir del establecimiento *in vitro* de escamas directamente de los bulbos *ex vitro*, la combinación de 1.0 mg.L⁻¹ BAP y 0.3 mg.L⁻¹ ANA fue efectiva. Sin embargo, en el experimento anterior quedó demostrado la efectividad de la ausencia de este regulador en la multiplicación de los microbulbos. Por ello, con el objetivo de optimizar la fase de multiplicación *in vitro* se diseñó un experimento tri-factorial donde interactuaron tres factores: reguladores del crecimiento (BAP y ANA), concentración de sacarosa (30 y 80 g.L⁻¹); y el ambiente físico del cultivo (luz y oscuridad) en la multiplicación *in vitro* de microbulbos. Después de los 42 días se evaluó el número de microbulbos por escamas; y el número de escamas en cada microbulbo formado en la etapa de multiplicación *in vitro*.

3.3 Aclimatización de microbulbos de *Lilium*.

En esta etapa de la experimentación se utilizaron microbulbos de *Lilium* provenientes de la multiplicación *in vitro*. Los microbulbos obtenidos contenían una masa fresca aproximadamente entre 0.9 y 1.2 g; y el volumen del microbulbo entre 5.1 a 6.02 cm³. La profundidad de siembra fue de 4 – 5 cm. Se sembraron en charolas de 32 cavidades (dimensiones 6 X 6 cm; y 8 cm de profundidad) que contenían sustrato (*peat moss* + termolita (proporción 1:1) (*peat moss*, Lambert, Canadian Sphagnum *peat moss*) (termolita, Hortiperl). El sustrato fue previamente esterilizado a 121 °C durante 1 hora a 1.2 atmósfera. Se procedió antes de la siembra a la aplicación de los siguientes biofertilizantes de fabricación por el grupo empresarial LABIOFAN, Cuba. Los biofertilizantes fueron: ECOMIC se añadieron 10 g antes de colocar el microbulbo en el fondo; y Microorganismos Eficientes se aplicó a una dosis de 100 ml/L encima del microbulbo antes de cubrir con el sustrato). Después de la aplicación de los biofertilizantes; y de la siembra los microbulbos se colocaron en las siguientes condiciones controladas: temperatura a 25 °C X 6 semanas y oscuridad; después golpe frío y oscuridad (5 °C X 2 semanas); y posteriormente a 25 °C con 16 horas luz; y 8 horas oscuridad X 6 semanas. En ambos tratamientos el tiempo de la

experimentación fue de 14 semanas; y la humedad relativa se mantuvo entre 80 a 90%. A las 14 semanas después de la siembra se procedió a realizar las siguientes evaluaciones: masa fresca del microbulbo; diámetro longitudinal y ecuatorial del microbulbo; y el volumen del microbulbo. El cálculo de volumen del microbulbo: se basa en considerar al microbulbo como un esferoide y no una esfera perfecta (Thakur *et al.* (2005); $V= 4 \pi \times (a/2)^2 \times c/2$ donde el calibre del microbulbo (a/c): (diámetro ecuatorial/diámetro longitudinal).

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de las condiciones para el establecimiento *in vitro* de *Lilium* sp. en la variedad Concador.

4.1.1 Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación e inducción de microbulbos de *Lilium in vitro*.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de los porcentajes de contaminación por hongo y bacterias, así como la supervivencia de los explantes a los 30 días del establecimiento *in vitro*. En general los mayores porcentajes de contaminación se alcanzaron en las escamas externas con pérdidas que oscilaron entre un 54.1- 21% por hongos y 51.4-20,8 % por bacterias. Las escamas medias también tuvieron altos porcentajes de contaminación por hongo que oscilaron entre un 50-12.5%, con excepción de la variedad Concador amarillo que no tuvo pérdidas por hongo. Pero presentó un 55% de contaminación por bacteria. En todas las variedades, las escamas internas fueron las que menor contaminación y mayor porcentaje de supervivencia presentaron. Entre las variedades, la Concador amarillo fue las de mayor contaminación por hongo y bacteria en las escamas internas, por lo que para esta variedad se requiere de una mejor preparación de los bulbos previo al establecimiento o ensayar un método de desinfección más intenso.

Cuadro 1. Efecto de la variedad y el tipo de explante en el porcentaje de contaminación por hongo y bacteria, así como la supervivencia. Letras diferentes dentro de una misma columna indican significación para valores de $p \leq 0.05$. Los datos se transformaron según $(2 \arccos(X/100))^{1/2}$

Variedad	Tipo de Escama	Hongo		Supervivencia
		(%)	Bacteria (%)	(%)
Concador A.	Externa	54,1 a	45,8 b	0,0 l
	Media	0,0 i	55.0 a	45,0 f
	Interna	33,3 e	26,6 e	40,0 gh
Santander B	Externa	43,9 d	39,3 c	16,6 j
	Media	50,0 bc	0,0 i	12,50 e

	Interna	0,0 i	0,0 i	100,0 a
Sorbone R	Externa	32,8 e	20,8 f	40,2 gh
	Media	14,2 g	14,3 h	71,4 e
	Interna	6,66 h	0,0i	93,3 c
Pavia A	Externa	51,8 abc	14,8 i	33,3 i
	Media	33,3 e	23,8 e	42,8 f
	Interna	6,89 h	1,72 h	91,4 c
Rosa Oscuro	Externa	48,6 g	51,4 a	0,0 l
	Media	45,4 d	15,9 gh	38,6 i
	Interna	14,0 e	12,5 ij	73,4 d
Naranja	Externa	54,7 a	33,9 d	11,3 k
	Media	12,5 g	34,3 d	53,1 e
	Interna	6,06 h	0,0 i	93,9 b
Rojo	Externa	48,7 c	51,2 a	0,0 i
	Media	21,8 f	25,0 e	53,1 de
	Interna	11,9 g	2,30 k	85,7 d
Significación		*	*	*

Al analizar el efecto del tipo de escama (interna, media y externa) independientemente de la variedad, se pudo observar que las escamas internas tuvieron un 80% de supervivencia con niveles bajos de contaminación por hongo (14%) y bacteria (8%) (Cuadro 1). A partir de estos resultados es conveniente utilizar ese tipo de escama para el establecimiento *in vitro* de variedades de Lilium, el empleo de otro tipo de explante sería menos efectivo.

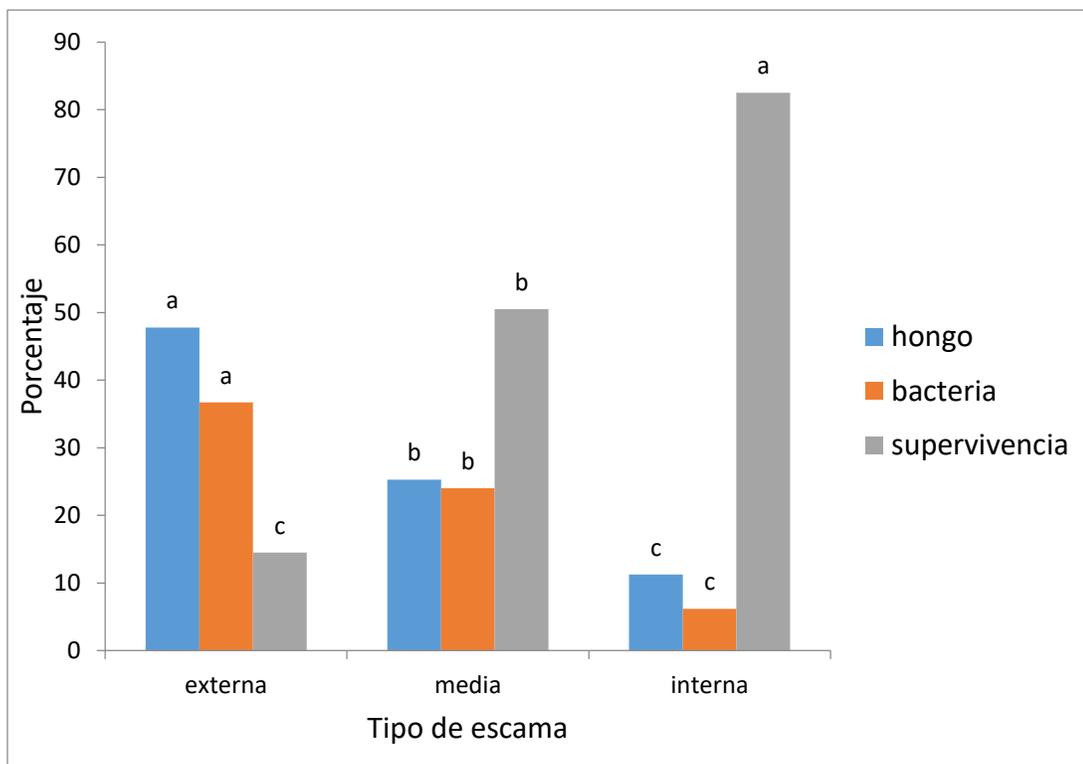


Figura 3. Porcentaje de pérdidas por hongo y bacteria, así como la supervivencia por tipo de escama, independientemente de la variedad, a los 42 días del establecimiento in vitro. (ANOVA. Prueba Tukey, Transformación: $2 \cdot \text{Arcosen}(X/100)^{1/2}$. Letras diferentes indican significación para valores de $p \leq 0.05$ $n=90$).

Al analizar el efecto del tipo de escama y la variedad en el porcentaje de explantes que formaron microbulbos las escamas media e internas de la variedad Rojo fue la mejor con un 82.3 y 80.5 % de respuesta respectivamente. En cuanto al número de microbulbos por escama; las escamas media de la variedad Concador y la media e interna de la variedad Santander blanco formaron 6.25; 6.18 y 5.75 microbulbos/escamas respectivamente con diferencias significativas del resto de las variedades. En general, en todas las variedades las escamas internas tuvieron mayor formación de microbulbos (Figura 3).

Cuadro 2. Nivel de respuesta de las variedades y el tipo de escama a los 42 días del establecimiento in vitro de escamas de Liliium. Letras diferentes dentro de cada columna indican significación para valores de $p \leq 0.05$; ANOVA: Tukey. Porcentaje transformación: $2\arccos(X/100)^{1/2}$. Número de bulbos: Transformación: $(X+0.5)^{1/2}$.

Variedades	Tipo escama	Porcentaje de explante que formaron microbulbos	Número microbulbos/escama
Concador	externa	0.0 i	0.0 f
	media	44.4 f	6.25 a
	interna	50.0 e	2.60 b
Santander Blanco	externa	0.0 h	0.0 f
	media	50.0 e	6.18 a
	interna	73.3b	5.75 a
Sorbone Rosa	externa	22.2 g	1.25 bcde
	media	44.4 d	3.70 bcd
	interna	77.5 b	3.28 bc
Pavia amarillo	externa	0.0 h	0.0 f
	media	44.4 d	1.25 ef
	interna	77.3 b	1.53 bcde
Rosa Oscuro	externa	0.0 h	0.0 f
	media	70.3 c	2.0 bcde
	interna	51.6 e	3.04 bcde
Naranja	externa	33.3 g	4.0 cde
	media	41.1 f	3.71 cde
	interna	41.9 f	4.53 bcde

Rojo	externa	0.0 h	0.0 f
	media	82.3 a	1.47 cde
	interna	80.5 a	1.75 bcde
Significación	Variedad	*	*
	Tipo escama	*	*
	Interacción	*	*

El número de microbulbos/escamas que se formaron estuvo marcadamente influenciado por la variedad. Las variedades del grupo *orientalis* (Concador, Santander y Sorbone) formaron entre 2.8 a 4.3 microbulbos mientras que en las asiáticas (Pavia A.; Rosa Oscuro; Naranja; Rojo) la formación de microbulbos fue comparativamente menor (Cuadro 2).

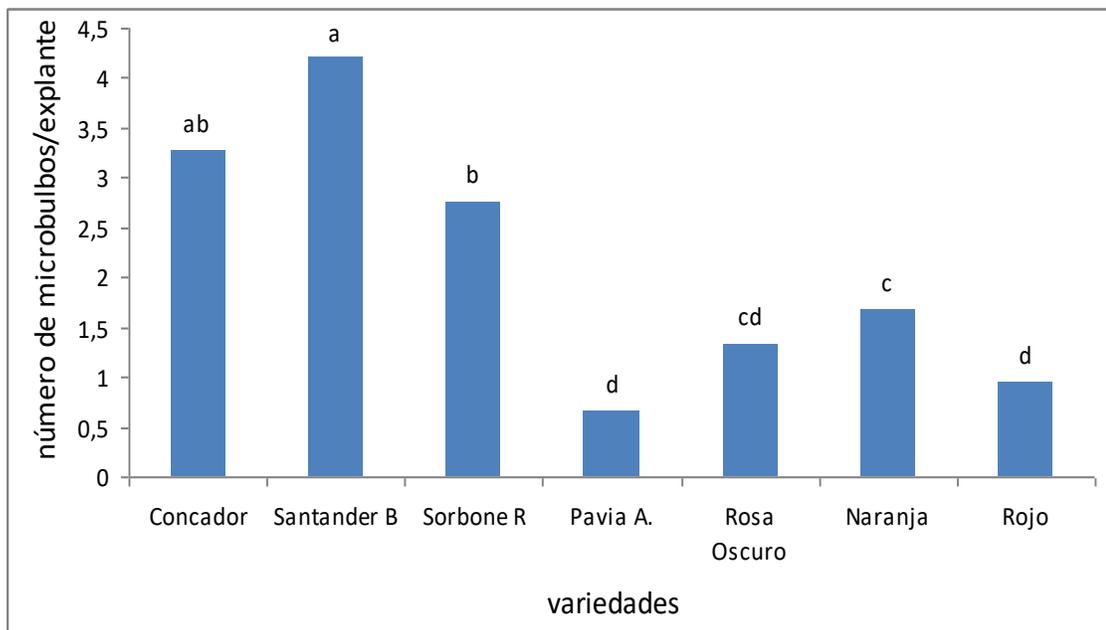


Figura 4. Número de microbulbos por explante que se formaron en cada una de las variedades independientemente del tipo de escama a los 42 días del establecimiento *in vitro*. Letras diferentes indican significación para valores de $p \leq 0.05$ (ANOVA: Prueba Tukey. Transformación: $(X+0.5)^{1/2}$. (n=90). (*Lilium orientalis*: Concador, Santander B, Sorbone R; *Lilium asiático*: Pavia A., Rosa Oscuro; Naranja; Rojo).

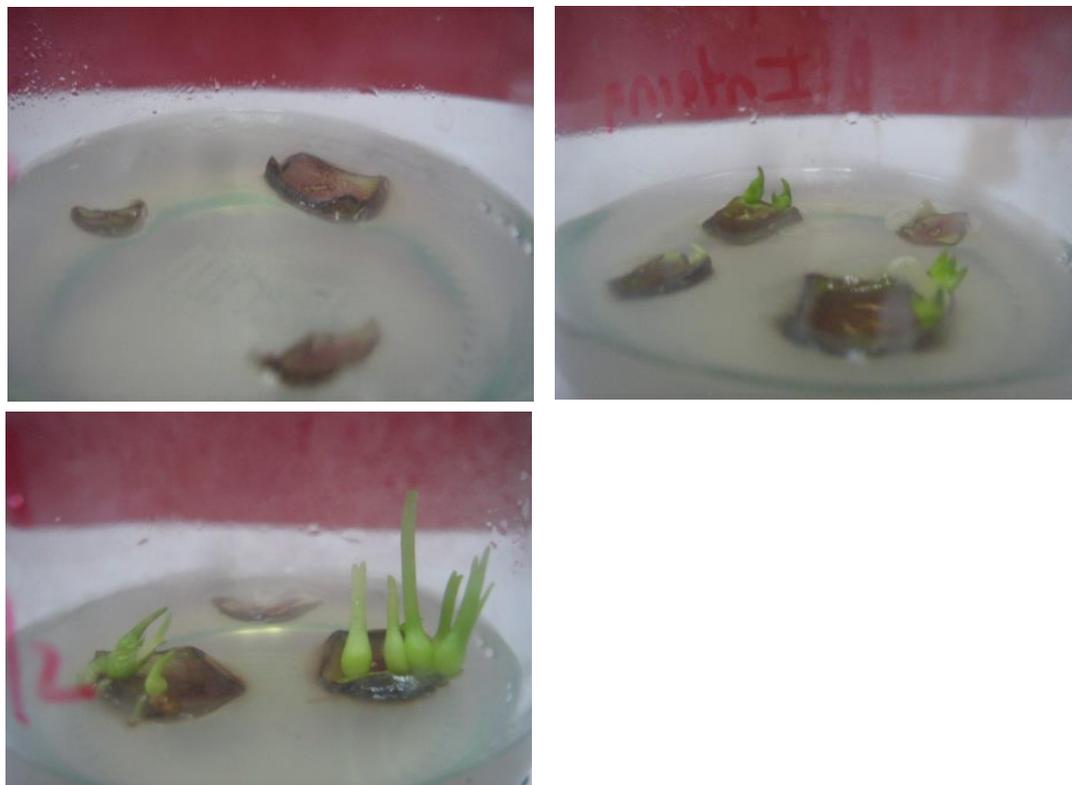


Figura 5. Formación de microbulbos a partir de escamas de bulbos ex vitro en medio de cultivo MS + 1.0 BA + 0.3 ANA y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Colocación adaxial de las escamas después de desinfectadas y con los respectivos cortes y punteaduras, iniciación de los microbulbos entre los 15 y 21 días y crecimiento de los microbulbos. En la foto se muestra la variedad asiática Rojo oscuro, muy precoz en la iniciación y crecimiento de los microbulbos. Ya en esta fase los microbulbos se separan de la escama y pasan a la etapa de multiplicación (altas concentraciones de sacarosa, ANA y oscuridad).

4.2 Multiplicación de microbulbos de Lilium a partir de escamas en medio semi-sólido.

4.2.1 Efecto de la concentración de sacarosa en la multiplicación de microbulbos de Lilium.

Al evaluar el efecto de la concentración de sacarosa en la multiplicación a partir de escamas se observó que en cuanto al número de microbulbos/escama no se encontraron diferencias significativas entre 60 y 80 g.L⁻¹, obteniéndose 2.4 y 2.8 microbulbos por escamas. Mientras que la concentración de 80 g.L⁻¹ aumentó significativamente el número promedio de escamas por microbulbo (4.0) y la masa fresca promedio de las escamas (0.085 g) (Figura 6).

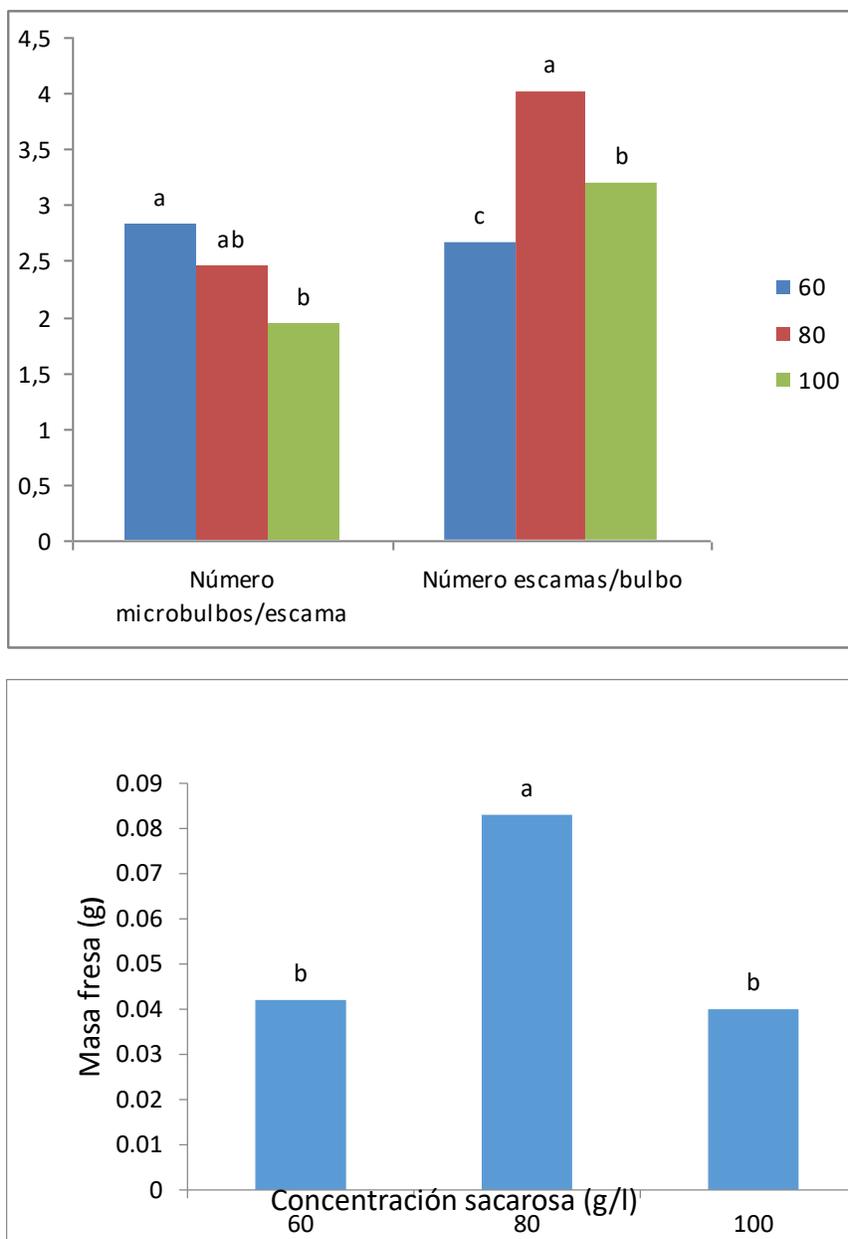


Figura 6. Efecto de la concentración de sacarosa (60, 80 y 100 g/L) en el número de microbulbos/escama, el número de escamas de cada microbulbo y la masa fresca promedio de las escamas a los 42 días de cultivo. Letras diferentes indican significación para valores de $p \leq 0.05$ (ANOVA, Tukey). Transformación de las variables: número de bulbos/escamas y número de escamas/bulbo: $(X+0.5)^{1/2}$. Los datos representan la media de 60 repeticiones.

A partir de estos resultados se confirmó la concentración de 80 g.L⁻¹ de sacarosa como la concentración óptima para la multiplicación de microbulbos de *Lilium* variedad Concador por su efecto en el número de microbulbos. Así como en el número de escamas por microbulbo y la masa fresca promedio de las mismas.

4.2.2 Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente in vitro en la multiplicación de microbulbos de *Lilium*.

Al analizar el efecto de los tres factores antes señalados se pudo comprobar que en la formación de microbulbos a partir de escamas procedentes de microbulbos *in vitro*, la concentración de ANA 0.3 mg.L⁻¹; 80 g.L⁻¹ de sacarosa en condiciones de oscuridad se logró incrementos significativos del número de microbulbos por escamas (3.05) y el número de escamas por microbulbo (4.5). En este último parámetro sin diferencias significativas con la presencia de BAP con 30 g.L⁻¹ sacarosa en condiciones de luz (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, y el microambiente in vitro en la formación de microbulbos y escamas por microbulbo de *Lilium* variedad Concador a los 42 días de cultivo. Los datos representan la media de 30 repeticiones. Los datos se transformaron según la siguiente expresión: $(X+0.5)^{1/2}$. Las letras en una misma columna indican diferencias significativas para valores de $p \leq 0.05$ (ANOVA, Tukey).

Regulador del crecimiento (mg/L)	Concentración sacarosa (g/L)	Ambiente	Número microbulbos/escama	Número escamas/microbulbo
1.0 BAP + 0.3 ANA	30	Luz	1.85 b	4.16 ab
	30	Oscuridad	1.95 b	2.95 b
	80	Luz	2.10 b	3.10 b
	80	Oscuridad	1.45 b	2.56 b
0.0 BAP + 0.3 ANA	30	Luz	1.35 c	2.55 b
	30	Oscuridad	2.65 b	3.61 b
	80	Luz	2.10 b	3.57 b

	80	Oscuridad	3.05 a	4.55 a
Significación	Regulador		0.101 NS	0.016 *
	Sacarosa		0.272 NS	0.514 NS
	Ambiente		0.136 NS	0.121 NS
		Interacción	0,023 *	0.002 **

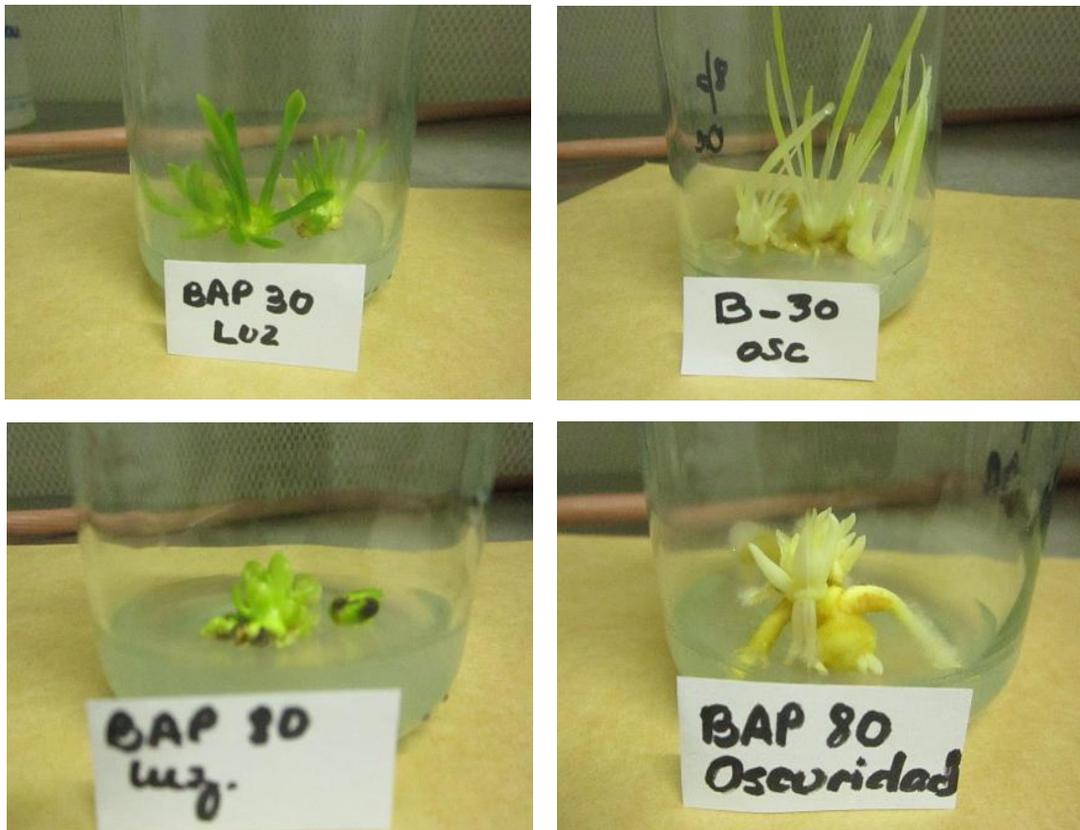


Figura 7. Efecto del BAP, concentración de sacarosa, luz y oscuridad en la formación de microbulbos. Nótese el papel de la sacarosa en el engrosamiento del microbulbo tanto a la luz como en la oscuridad. Las concentraciones de 30 g.L⁻¹ provocaron la formación de hojas alargadas.

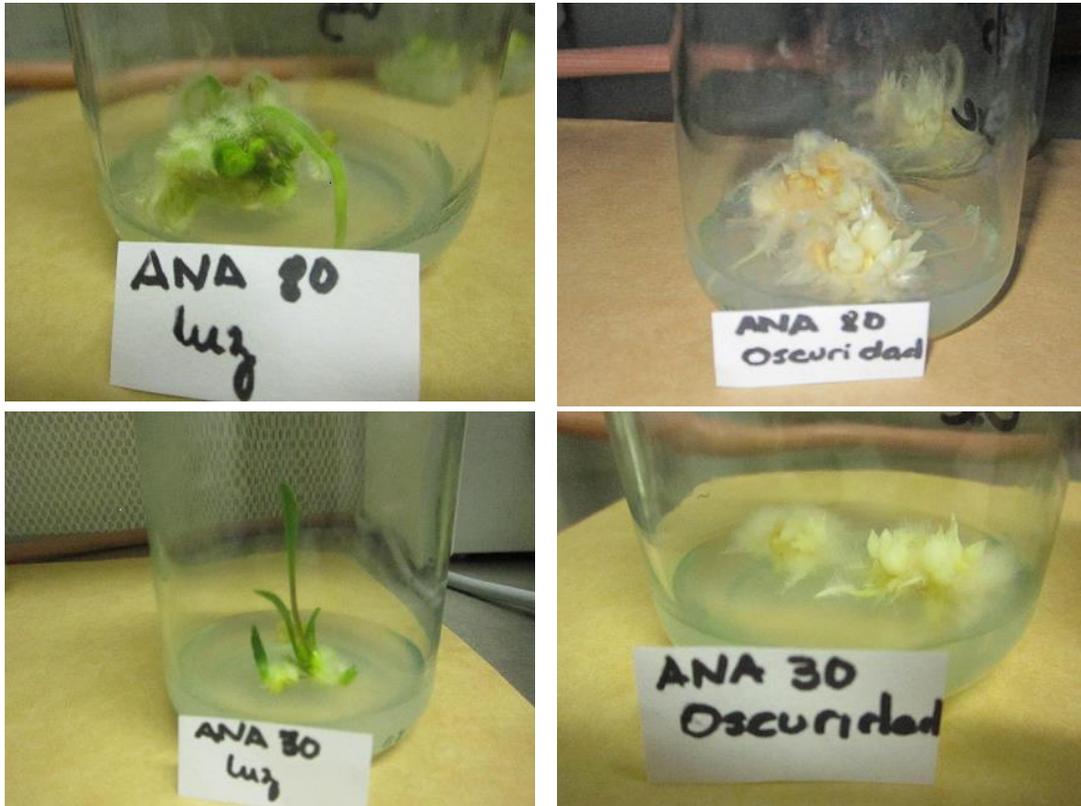


Figura 8. Efecto del ANA, concentración de sacarosa, luz y oscuridad en la formación de microbulbos. Nótese el papel de la sacarosa en el engrosamiento del microbulbo tanto a la luz como en la oscuridad. Las concentraciones de 30 g.L⁻¹ a la luz provocan la formación de hojas alargadas mientras que en la oscuridad continúa el microbulbo formado.

Con el objetivo de lograr un menor número de raíces teniendo en cuenta que desde la fase de establecimiento venía utilizando 0.3 mg.L⁻¹ ANA se diseñó el siguiente experimento. Se tomaron escamas de los microbulbos provenientes de la etapa de multiplicación. Se les aplicó un corte en la porción distal y se colocaron en el medio de cultivo en posición adaxial. El medio de cultivo fue el MS suplementado con 80g.L⁻¹ de sacarosa (mejor resultados del experimento anterior). Se ensayaron cuatro concentraciones de ANA: 0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg.L⁻¹. A los 42 días se determinó el número de microbulbos formados en cada escama, la masa fresca de los microbulbos, el número de escamas por microbulbos. Así como la masa fresca de las raíces por la imposibilidad de cuantificar el número de raíces.

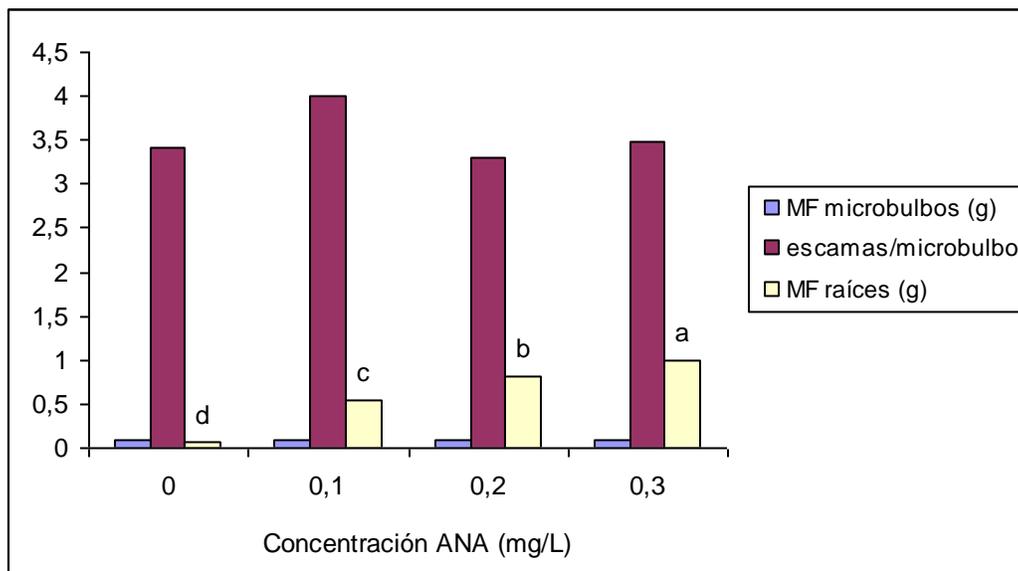
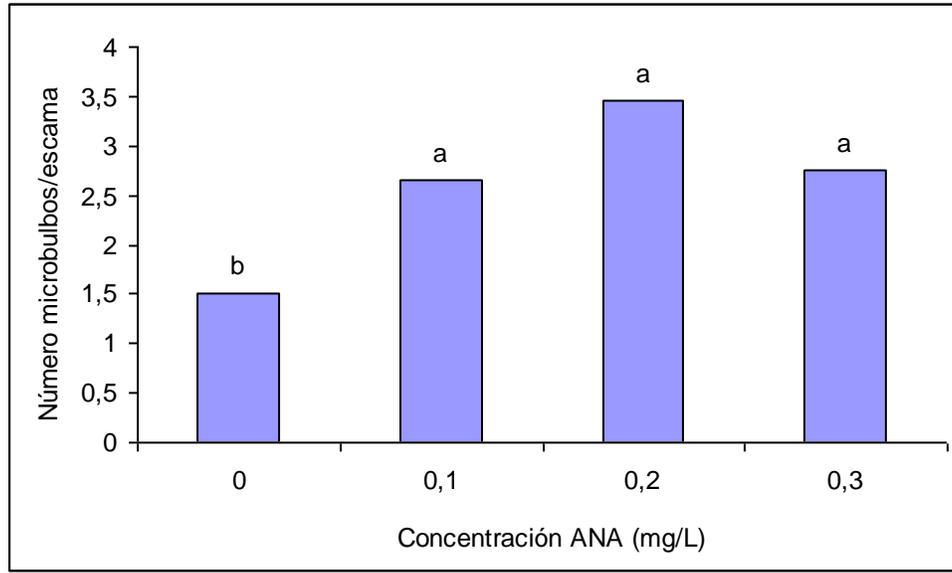


Figura 9. Efecto de la concentración de ANA (0, 0.1, 0.2 y 0.3 mg. L⁻¹) en el número de microbulbos por escama, la masa fresca de los microbulbos, el número de escamas de cada microbulbo, y la masa fresca de las raíces a los 42 días de cultivo. Letras diferentes indican significación para valores de $p \leq 0.05$ (ANOVA, Tukey). Transformación de las variables: número de bulbos/escamas y número de escamas/bulbo: $(X+0.5)^{1/2}$. Los datos representan la media de 60 repeticiones.

Al evaluar el efecto de la concentración de ANA en la formación de microbulbos por escama no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones que se ensayaron. Pero si con el tratamiento control. Es decir que la aplicación de ANA en la etapa de

multiplicación *in vitro* constituye un factor importante en la formación de microbulbos. No existieron diferencias en la masa fresca de los microbulbos y el número de escamas por microbulbo. Sin embargo, a medida que se incrementó la concentración de ANA aumentó significativamente la cantidad de raíces (Figura 9). A partir de este resultado se selecciona la concentración de 0.2 mg.L⁻¹ ANA como la adecuada para la etapa de multiplicación de microbulbos a partir de escamas. En la figura 10 se resume el protocolo para el establecimiento y la multiplicación de microbulbos de *Lilium* de la variedad Concador en medio semi-sólido. A las escamas internas de los bulbos una vez desinfectadas se le realizan cortes en la zona proximal y distal, así como punteaduras en la porción media de la escama. Las mismas se colocan en posición adaxial en el medio de cultivo MS + 1.0 BA + 0.3 ANA, 30 g.L⁻¹ sacarosa a la luz por 42 días. Los microbulbos formados se separan de la escama y se colocan en medio de multiplicación (MS + 0.2 mg.L⁻¹ ANA +80 g.L⁻¹ sacarosa a la oscuridad) por 42 días. A los microbulbos se les eliminan las raíces y las escamas se individualizan. Se les realiza un corte en la zona distal y se colocan en medio fresco de multiplicación para la formación de nuevos microbulbos. Con el objetivo de lograr microbulbos de mayor calidad se recomienda emplear solo las escamas de mayor tamaño de los microbulbos (aproximadamente 2-4 escamas). Este proceso se realiza de forma cíclica y permite incrementar el material de multiplicación *in vitro*. Por este procedimiento es posible obtener un promedio de 3 microbulbos por escama. Este protocolo se ha venido implementando para la multiplicación de microbulbos a partir de escamas para el resto de las variedades que fueron establecidas *in vitro*.

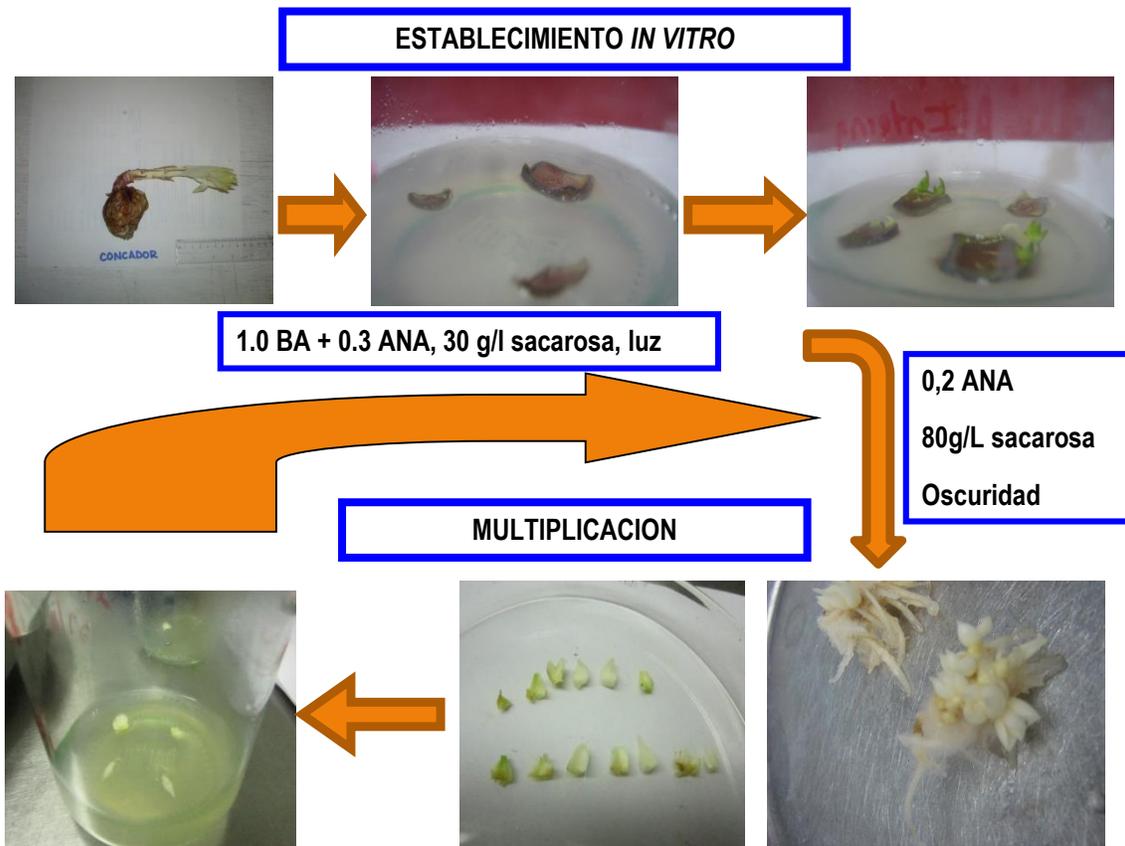


Figura 10. Esquema que resume el protocolo para el establecimiento y la multiplicación de microbulbos de *Lilium* en medio semi-sólido.

4.3 Aclimatización de microbulbos de *Lilium*.

En la figura 11 se ilustra el crecimiento y enraizamiento alcanzado en el microbulbo tratado con ECOMIC; con diferencias marcadas respecto a los restantes tratamientos. En las plantas bulbosas la calidad de la floración depende del almacenamiento de agua y sustancias nutritivas de reservas del bulbo. Donde la cantidad de éstas es dependiente del tamaño del bulbo; y para lograr estos elementos el cultivo requiere una buena formación de raíces. Por otra parte, en la figura 12 se observa los mayores valores alcanzados de masa fresca y volumen del microbulbo que se obtuvieron en el tratamiento con ECOMIC con marcadas diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos. Lo cual nos indica el efecto marcado del ECOMIC para la formación de raíces en el microbulbo, elemento importante para la absorción de nutriente y acumulación de reservas para obtener

flor con la calidad que demanda la norma comercial, lo que se hace necesaria la fertilización adicional. En *Lilium* así como en otras plantas de bulbo, se debe producir un proceso de acumulación de carbohidratos, lo cual se realiza mediante forzamiento en invernadero hasta obtener una planta madura que tenga la capacidad de formación de flores (Castro y Londoño, 2008). Los bulbos poseen escamas carnosas, principales órganos almacenadores de agua y sustancias nutritivas (Schiappacasse, 1999). El nitrógeno en los bulbos es insuficiente para cubrir completamente el período de crecimiento y asegurar un rendimiento máximo de 3 bulbos hijos (Ohyama *et al.*, 1988). Por tanto, la fertilización nitrogenada se considera determinante en la producción de flores y bulbos (De Hertogh y Le Nard, 1993; Pinochet, 1999). En particular, el momento de aplicación es crítico debido a razones económicas y ambientales (Gastal y Lemaire, 2002; Olf *et al.*, 2005); según Matus (1996) se debe definir con base en las tasas de crecimiento y absorción de N del cultivo. Para obtener un producto de calidad es necesario lograr una buena formación de raíces (Betancourt *et al.*, 2005).

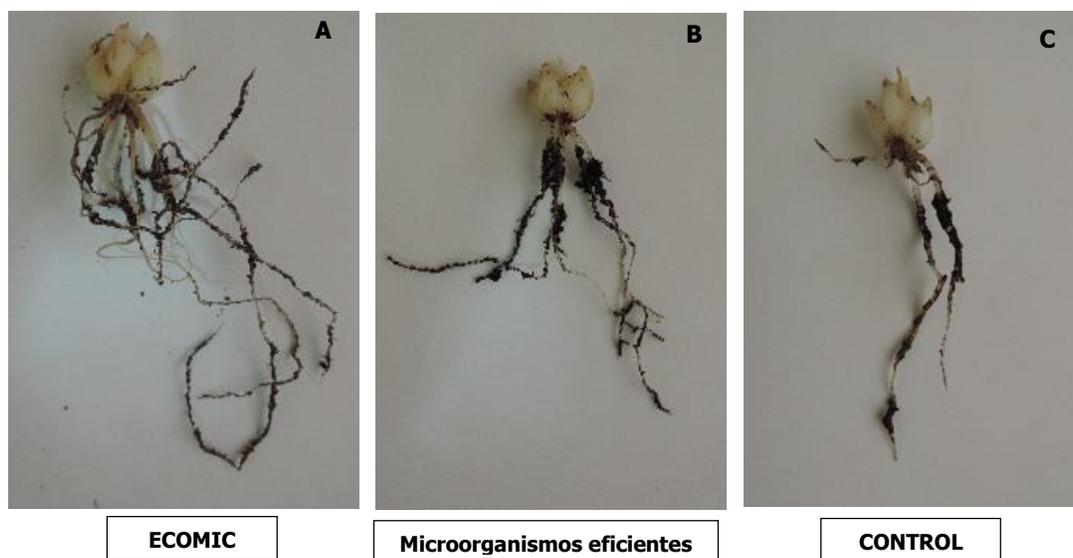


Figura 11. Efecto de biofertilizantes en el desarrollo de microbulbos de *Lilium* provenientes de la micropropagación en la etapa de aclimatización.

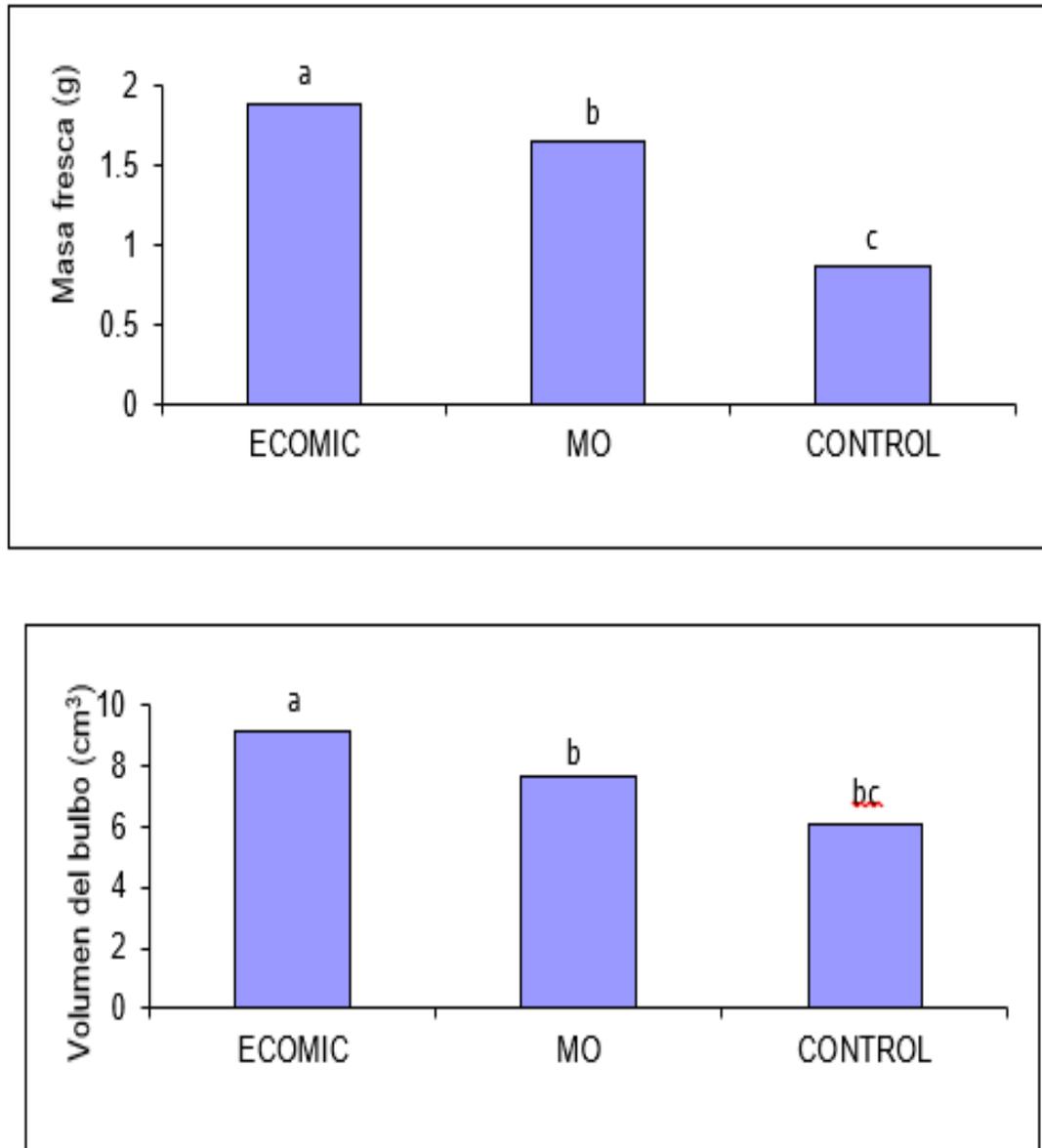


Figura 12. Efecto de biofertilizantes en la masa fresca y en el volumen de microbulbos de *Lilium* provenientes de la micropropagación en la etapa de aclimatación. En cada figura, medias con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p \leq 0.05$).

5.0 CONCLUSIONES

1. Se logró un protocolo para la propagación *in vitro* de *Lilium* en la variedad Concolor.
2. Se observó la mayor eficiencia en el establecimiento *in vitro* de *Lilium* mediante la implantación de las escamas internas del bulbo donante. Donde se observaron los menores valores en contaminación; mayor supervivencia y mayor respuesta en la formación de microbulbos
3. Las mejores condiciones para la multiplicación de microbulbos de *Lilium* se lograron en condiciones de oscuridad, pero con el uso de 0.2 mg. L⁻¹ de ANA y 80 g. L⁻¹ de sacarosa.
4. La aclimatización de los microbulbos de *Lilium* en sustrato de *peat moss* + termolita; y con la aplicación de biofertilizantes mostró los mejores resultados en la masa fresca y volumen del microbulbo con marcadas diferencias respecto al resto de los tratamientos.

6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Sánchez, M. E., Maldonado-Torres, R., García-Mateos, R., Almaguer-Vargas, G., Rupit-Ayala, J., & Zavala-Estrada, F. (2008). Suministro de calcio en el desarrollo y nutrición de *Lilium asiático*. *Agrociencia*, 42(8), 881-889.

Auzaque-Rodríguez, O., Balaguera-López, H. E., Álvarez-Herrera, J. G., & Fischer, G. (2009). Efecto de la vernalización de bulbos reutilizados sobre la calidad de la flor de lirio (*Lilium sp.*) en la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana*, 27(1), 65-71.

Bañon, A. S.; R. D. Cifuentes; H. J. A. Fernández; G. González. 1993. *Gerbera, lilium, tulipán y rosa*. Mundi – prensa. Madrid, España. Pp. 250.

Bhromsiri, C. y Bhromsiri, A. (2010). Los efectos de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas y los hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento, desarrollo y absorción de nutrientes de diferentes ecotipos de vetiver. *Revista tailandesa de ciencias agrícolas*, 43 (4), 239-249.

Bunty Shylla, BS, Ashutosh Bhaik, AB, Anil Handa, AH y Thakur, PD (2005). Incidencia del carlavirus asintomático del lirio en *Lilium* cultivado en invernaderos en Himachal Pradesh.

Cabrera, G. E. G. (2002). Efecto del sustrato y del tamaño de la escama en la inducción de bulbillos de siete cultivares de *Lilium x hybridum Hort.* BSc, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía.

Castro, D., & Londoño, S. (2008). Producción in vitro de microbulbos de lirio (*Lilium sp.*). *Temas Agrarios*, 13 (1), 5-13.

Chávez, A. R., & Aquino Jara, A. S. (2012). Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Sclerotium sp.* con extractos vegetales. *Investigación Agraria*, 14(1), 17-23.

Conijn, CGM (2014, abril). Avances en el control de las enfermedades de los lirios. En III Simposio Internacional sobre el Género *Lilium* 1027 (págs. 213-229).

cortadas y plantas en maceta., P. a. S. P. P. L. C. F. (s/f). Los *Liliums*: Sus aplicaciones como flores cortadas y de plantas en maceta. Onings.com. Recuperado el 9 de abril de 2024, de <https://onings.com/wp-content/uploads/Lilium-Forcing-Guide-Spanish.pdf>

de Agricultura y Desarrollo Rural, S. (s/f). Lista la producción de flores ornamentales para atender la demanda por el 14 de febrero . gov.mx. Recuperado el 21 de mayo de 2024, de

<https://www.gob.mx/agricultura/prensa/lista-la-produccion-de-flores-ornamentales-para-atender-demanda-por-el-14-de-febrero>

Facchinetti, C., & Marinangeli, P. A. (2008). Avances en la producción nacional de bulbos de liliium.

García Velasco, R., & Companioni González, B. (2019). Liliium: situación actual en México. TECSISTECATL: Revista de Economía y Sociedad de México, (diciembre).

George, E. 1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegenetics Ltd., Edington, p888-892.

Gómez-Gómez, A. A. (2010). La situación de las flores de corte mexicanas dentro de la política comercial internacional de México. Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Económico Administrativas, 2(9).

Herbácea, EL es U., De copa, LCAHTFG y. D. de TT, & de trompeta o turbante. Sus tallos son largos con hojas sésiles. Está constituido por un bulbo de tipo escamoso con un disco en su base del disco salen unas raíces carnosas. (s/f). Trompeta o turbante . Gob.mx. Recuperado el 9 de abril de 2024, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/96261/Lilium_monografias.pdf

Herreros, D. L. M. (1983). Cultivo de Liliium. Servicio de extensión agraria Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España, 28.

Hertogh, A. D. (1996). Holland bulb forcer's guide (No. Ed. 5, pp. 587-pp).

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. Recent advances in plant in vitro culture, 6(10), 1-28.

Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., & Ademoyegun, O. T. (2009). El cultivo de tejidos como técnica de producción vegetal para cultivos hortícolas. Revista Africana de Biotecnología , 8 (16).

Iturbide-Zuñiga, A. S., Colinas-León, M. T. B., Lozoya-Saldaña, H., Medina-Moreno, S. A., & Ayala-Arreola, J. (2017). In vitro evaluation of extracts from the Liliium genus to control Fusarium oxysporum. Revista mexicana de fitopatología, 35(3), 611-622.

Juárez Hernández, M. (2010). Relaciones de amonio-cationes, de fósforo-aniones y presión osmótica de la solución nutritiva en liliium híbrido asiático.

Kapoor, R., Kumar, S. y Kanwar, JK (2006) Regeneración de bulbos a partir de explantes de hojas y entrenudos de lirios híbridos orientales. *Floricultura y Biotecnología Ornamental*, 2 (2), 49-51

Keng, H. C; Y. W. Rung; C. C. Keng; F. H. Ting; S. C. Ren. 2010. Effects of chemical and organic fertilizer on the growth, flower quality and nutrient uptake of *Anthurium andreaeanum*, cultivated for cut flower production. *Scientia Horticulturae* 125:434441 DOI:10.1016/j.scienta.2010.04.011.

Leyva-Mir, S. G., López-Hernández, Y., Tlapal-Bolaños, B., & Flores-Martínez, R. (2009). Etiología del tizón descendente de las ramas de azucena híbrida (*Lilium* spp.) en Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 5-8.

Magos-García, K., Leyva-Mir, S. G., & Mariscal-Amaro, L. A. (2010). Etiología de la Pudrición de Bulbo y Tallo de la Azucena Híbrida (*Lilium* Spp.) y su Control en el Estado de México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 162-164.

Mir, JI, Ahmed, N., Itoo, H., Sheikh, MA, Rashid, R. y Wani, SH (2012). Propagación in vitro de *Lilium* (*Lilium longiflorum*). *Revista India de Ciencias Agrícolas*, 82 (5), 455.

Morales, C., & Arbeláez, J. D. (2015). La producción de lirios (*Lilium* spp.) como flor de corte para exportación. Una revisión. *Revista Universidad Católica de Oriente*, 28(39), 45-60.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Neetu Thakur, NT, Kaur, R., Sharma, DR, Hemant Gautam, HG y Manisha Mangal, MM (2002). Efecto de ciertos químicos y sacarosa sobre el aumento del tamaño del bulbo in vitro de *Lilium* sp. (híbrido asiático) cv. Toscana.

Nhut, D. T. (1998). Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Reports*, 17(12), 913-916.

Nhut, D. T. (1998). Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Reports*, 17(12), 913-916.

Ortega-Blu, R., Correa-Benguria, M., & Olate-Muñoz, E. (2006). Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. para flor de corte. *Agrociencia*, 40(1), 77-88.

- Pandey, RK, Singh, AK y Mamta Sharma, MS (2009). Propagación in vitro de *Lilium*.
- Pelkonen, V. P. (2005). Biotechnological approaches in lily (*Lilium*) production.
- Procolombia. 2015. Flores. Obtenido de Procolombia 25: <http://www.procolombia.co/node/1255> (11 de abril de 2023).
- RODRÍGUEZ PEDROSO, A. T., RAMÍREZ ARREBATO, M. A., BAUTISTA BAÑOS, S., CRUZ TRIANA, A., & RIVERO, D. (2012). Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the in vitro growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.
- Saifullah, K., Sheeba, N., Mariam, R., Naheed, K., Asma, N., & Bushra, S. (2010). Cultivation of lilies (*Lilium regale*) for commercialization in Pakistan. *Pak. J. Bot*, 42(2), 1103-1113.
- Salinger, J. 1991. Producción comercial de flores. Zaragoza, Acribia. 371p.
- Salisbury, F. B., & Jensen, W. A. (1988). *Botánica*. McGraw-Hill Interamericana.
- Seemann, P., & Andrade, N. (1999). Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales. Universidad Austral de Chile.
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11), 1269-1278.
- Stimart, D. y P. Ascher. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 103: 182-184.
- Streck, NA y Schuh, M. (2005). Simulando la respuesta de vernalización del lirio "reina de las nieves" (*Lilium longiflorum* thunb.). *Scientia Agrícola* , 62 , 117-121.
- Thakur, R., Sood, A., Nagar, PK, Pandey, S., Solti, RC y Ahuja, PS (2006). Regulación del crecimiento de plántulas de *Lilium* en medio líquido mediante aplicación de paclobutrazol o ancymidol, para su adaptabilidad en un sistema biorreactor: parámetros de crecimiento. *Informes de células vegetales* , 25 , 382-391.
- 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*, 5(SPE9), 1795-1801.

Van Doorn, J., Vreeburg, PJM, Van Leeuwen, PJ y Dees, RHL (abril de 2008). La presencia y supervivencia de la pudrición blanda (*Erwinia*) en sistemas de producción de bulbos de flores. En X Simposio Internacional sobre Bulbos de Flores y Plantas Herbáceas Perennes 886 (págs. 365-379).

Vinueza, S., Crozzoli, R., & Perichi, G. (2006). Evaluación in vitro de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Fitopatología de Venezuela*, 19, 26-31.

Xu, L. y Ming, J. (2022). Desarrollo de un ensayo de RT-PCR múltiple para la detección simultánea del virus asintomático de Lily, el virus del moteado de Lily, el virus del mosaico del pepino y el virus del mosaico de *Plantago asiatica* en Lily. *Revista de Virología* , 19 (1), 219.