

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE NUEVE VARIEDADES BOTÁNICAS DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NINE BOTANICAL VARIETIES OF *Tigridia pavonia* (L.f.) DC

José Luis Piña-Escutia¹, César Vences-Contreras¹, M. Guadalupe Gutiérrez-Martínez¹, L. Miguel Vázquez-García¹, Amaury M. Arzate-Fernández²

¹Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca. Km 11.5. entronque al Cerrillo. Centro Universitario "El Cerrillo". 50200. Toluca, México. ²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. Km. 9.6. Libramiento Norte Carretera Irapuato-León. Apartado Postal 629. 36500. Irapuato, Guanajuato. (amaury1963@yahoo.com.mx).

RESUMEN

Tigridia pavonia (L.f.) DC es una planta bulbosa nativa de México con potencial ornamental alto. México es considerado el centro de mayor diversidad de esta especie, por lo cual, el estudio de su diversidad genética y fenotípica es muy importante para establecer estrategias de manejo, conservación y utilización en programas de mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue caracterizar nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC, con 21 marcadores morfológicos y cinco moleculares ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas). Las variedades fueron recolectadas en tres municipios del Estado de México: Tenancingo (2100 m), Temascaltepec (2250 m) y Temoaya (2600 m). La distancia genética promedio para morfología fue 0.54, mientras que para ISSR fue 0.49. Así, ambos tipos de marcadores mostraron diversidad genética entre las variedades, distinguiendo a cada una de ellas. Los dendrogramas de los marcadores morfológicos e ISSR fueron notablemente similares, existiendo una correlación positiva entre ellos ($R=0.30$) y, en ambos casos, hubo una relación de las nueve variedades según su origen geográfico. Sin embargo, los marcadores ISSR fueron más efectivos, pues con un solo iniciador se distinguió a todas las variedades de *T. pavonia*. Se concluye que los marcadores ISSR son una herramienta útil para la discriminación rigurosa de genotipos y que se pueden usar de manera complementaria a la caracterización morfológica.

Palabras clave: *Tigridia pavonia*, caracterización morfológica, Inter-Secuencias Simples Repetidas.

ABSTRACT

Tigridia pavonia (L.f.) DC is a bulbous native plant of México with high ornamental potential. México is considered the center of greatest diversity of this species, thus the study of its genetic and phenotypic diversity is very important for establishing strategies of management, conservation and use in plant breeding programs. The objective of the present study was to characterize nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC, with 21 morphological markers and five ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. The varieties were collected in three municipalities of the Estado de México: Tenancingo (2100m), Temascaltepec (2250 m) and Temoaya (2600 m). The average genetic distance for morphology was 0.54, whereas for ISSR it was 0.49. Thus, both types of markers showed genetic diversity among the varieties, distinguishing each one of them. The dendrograms of the morphological markers and ISSR were notably similar, showing a positive correlation between them ($R=0.30$), and in both cases, there was a relationship of the nine varieties according to their geographic origin. However, the ISSR markers were more effective, because with a single primer all of the varieties of *T. pavonia* were distinguished. It was concluded that the ISSR markers are a useful tool for the rigorous discrimination of genotypes and that they can be used as a complement to morphological characterization.

Key words: *Tigridia pavonia*, morphological characterization, Inter-Simple Sequence Repeat.

INTRODUCTION

T*igridia pavonia* (L.f.) DC, also known as tiger flower or oceloxóchitl, is a species native to México which was used by the Aztecs for ornamental, nutritional and medicinal purposes

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Febrero, 2009. Aprobado: Noviembre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 147-158. 2010.

INTRODUCCIÓN

T*igridia pavonia* (L.f.) DC., también conocida como flor del tigre u oceloxóchitl, es una especie nativa de México que fue utilizada por los aztecas como ornamental, alimenticia y medicinal (Hernández, 1959) y debido a la gran variabilidad en el colorido de su flor y su potencial ornamental, es uno de los principales recursos fitogenéticos de este país, considerado el centro de mayor diversidad genética de esta especie. *Tigridia pavonia* se encuentra ampliamente distribuida en diferentes países de Europa, Asia y Australia, donde es comercializada como planta para jardín (Vázquez-García *et al.*, 2001a). Esto puede ocasionar que la extracción de material silvestre y la falta de un manejo racional de la especie conduzca a su erosión genética (Vázquez-García *et al.*, 2001b).

El conocimiento de la diversidad genética de especies ampliamente distribuidas es importante para su conservación y distinción genética y fenotípica, pues generalmente muestran variación morfológica, fisiológica y en la estructura genética de sus poblaciones (Wen y Hsiao, 2001). Esta variación puede deberse a diversos factores como el altitudinal, por lo que es común encontrar diferentes fenotipos de una misma especie, entre poblaciones desarrolladas a diferentes altitudes (Ohsawa e Ide, 2007). Por lo anterior, se ha sugerido el desarrollo de los análisis morfológicos en combinación con los moleculares para mejorar la distinción entre especie o variedad dentro de los géneros o dentro de las especies de un género (Rodríguez y Sytsma, 2005).

Los marcadores morfológicos o fenotípicos han sido utilizados tradicionalmente para distinguir variedades (Tapia *et al.*, 2005a; Adugna *et al.*, 2006). Así, Vázquez-García *et al.* (2001a) describieron morfológicamente nueve variedades botánicas de *T. pavonia*, provenientes de tres lugares con diferente altitud. Sin embargo, este tipo de caracterización no siempre refleja la variación genética real, debido a que el fenotipo está determinado parcialmente por la información genética del individuo, e influenciado por el ambiente donde se desarrolla (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001).

Los marcadores bioquímicos o isoenzimas también han sido usados para distinguir genotipos estrechamente relacionados. Así, Arzate-Fernández *et al.* (2008) caracterizaron nueve variedades de *T.*

(Hernández, 1959), and due to the great variability of the coloring of its flower and its ornamental potential, it is one of the principal phylogenetic resources of this country, considered the center of greatest genetic diversity of this species. *Tigridia pavonia* is widely distributed in different countries of Europe, Asia and Australia, where it is commercialized as a garden plant (Vázquez-García *et al.*, 2001a). Consequently, the extraction of wild material and the lack of rational management of the species can lead to its genetic erosion (Vázquez-García *et al.*, 2001b).

The knowledge of the genetic diversity of widely distributed species is important for their conservation and genetic and phenotypic distinction, because they generally present morphological and physiological variation, as well as in the genetic structure of their populations (Wen and Hsiao, 2001). This variation may be due to diverse factors such as altitude, thus it is common to find different phenotypes of the same species among wild populations developed at different altitudes (Ohsawa and Ide, 2007). Therefore, the development of the morphological analyses has been suggested in combination with the molecular analyses to improve the distinction among species or variety within the genera or within the species of a genus (Rodríguez and Sytsma, 2005).

Morphological or phenotypic markers have been used traditionally to distinguish varieties (Tapia *et al.*, 2005a; Adugna *et al.*, 2006). Thus, Vázquez-García *et al.* (2001a) morphologically described nine botanical varieties of *T. pavonia*, from three locations with different altitude. However, this type of characterization does not always reflect the real genetic variation, because the phenotype is still partially determined by the genetic information of the individual, and influenced by the environment where it is developed (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001).

Biochemical or enzymatic markers have also been used to distinguish closely related genotypes. Arzate-Fernández *et al.* (2008) characterized nine varieties of *T. pavonia*, with nine enzymes. However, although this technique is reproducible and relatively inexpensive, it generally shows low levels of polymorphism and may be limited by the influence of the environment and the development stages of the plant (Vicente and Fulton, 2003).

The use of DNA markers supports the selection of plants, given that it makes it possible to detect

pavonia, con nueve isoenzimas. No obstante, aunque esta técnica es reproducible y relativamente barata, generalmente muestra niveles bajos de polimorfismo y puede estar limitada por la influencia del ambiente y los estados de desarrollo de la planta (Vicente y Fulton, 2003).

El uso de marcadores de ADN apoya la selección de plantas, pues permite detectar lugares específicos de las secuencias de genes que difieren entre cultivares o líneas mejoradas (Suslow *et al.*, 2005). La técnica de ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas) consiste en la amplificación de segmentos de ADN entre dos microsátélites. El microsátélite usado como iniciador, generalmente está formado de secuencias cortas repetidas (1-6 pb) y distribuidas ampliamente en los genomas eucariotas, por lo que pueden mostrar polimorfismos en las plantas. Además, estos iniciadores pueden contener un ancla en los extremos 3' o 5', que contiene una, dos o tres bases adicionales al microsátélite, con lo que aumenta su especificidad (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001).

Los marcadores ISSR han sido utilizados exitosamente para calcular la diversidad genética intra o inter-específica en diferentes especies domesticadas y silvestres (Arzate-Fernández *et al.*, 2005; Escandón *et al.*, 2005b; Tapia *et al.*, 2005b), y son superiores otro tipo de técnicas por su rapidez, reproducibilidad y eficiencia altas para detectar polimorfismos (Pradeep *et al.*, 2002).

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) caracterizar nueve variedades botánicas de *T. pavonia* mediante marcadores morfológicos y moleculares ISSR; 2) correlacionar la eficiencia de ambos marcadores en la diferenciación de las variedades de *T. pavonia* evaluadas; 3) conocer la correlación entre los patrones generales de variación genética y la altitud de muestreo de cada variedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC, recolectadas en tres localidades del Estado de México con registro en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). La variedad Sandra (TGD-008-030408) fue recolectada en el municipio de Tenancingo (2100 m), Carolina (TGD-002-030408), Trinidad (TGD-009-030408), Penélope (TGD-006-030408), Ángeles (TGD-001-030408),

specific places of the gene sequences that differ among cultivars or improved lines (Suslow *et al.*, 2005). The ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) consists in the amplification of DNA segments between two microsattellites. The microsattellite used as primer is generally formed by short repeated sequences (1-6 pb) that are widely distributed in the eukaryote genomes, thus they can show polymorphism in plants. Furthermore, these primers may contain an anchor in ends 3' or 5', which contains one, two or three additional bases to the microsattellite, which increases its specificity (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001).

The ISSR markers have been successfully used to calculate the intra or inter-specific genetic diversity in different domesticated and wild species (Arzate-Fernández *et al.*, 2005; Escandón *et al.*, 2005b; Tapia *et al.*, 2005b), and are superior to other types of techniques because of their speed, reproducibility and high efficiency for detecting polymorphism (Pradeep *et al.*, 2002).

The objectives of the present study were as follows: 1) to characterize nine botanical varieties of *T. pavonia* through morphological and ISSR molecular markers; 2) to correlate the efficiency of both markers in the differentiation of the varieties of *T. pavonia* evaluated; 3) to know the correlation among the general patterns of genetic variation and the sampling altitude of each variety.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC were used, collected in three localities of the Estado de México registered in the National Seed Inspection and Certification Service (SNICS). The Sandra variety (TGD-008-030408) was collected in the municipality of Tenancingo (2100 m), Carolina (TGD-002-030408), Trinidad (TGD-009-030408), Penélope (TGD-006-030408), Ángeles (TGD-001-030408), Dulce (TGD-003-030408) and Mariana (TGD-005-030408), in the municipality of Temascaltepec (2250 m) and Samaria (TGD-007-030408) and Gloria (TGD-004-030408) in the municipality of Temoaya (2600m). All of the varieties were cultivated in a mixture of mountain earth, sand and bovine manure (proportion 1:1:1), in a rustic greenhouse, of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de México, at 2600 m.

Dulce (TGD-003-030408) y Mariana (TGD-005-030408), en el municipio de Temascaltepec (2250 m) y Samaria (TGD-007-030408) y Gloria (TGD-004-030408) en el municipio de Te-moaya (2600 m). Todas las variedades fueron cultivadas en una mezcla de tierra de monte, arena y estiércol bovino (proporción 1:1:1), en un invernadero tipo rústico, de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, a 2600 m.

Análisis morfológico

Para elaborar la matriz de datos morfológicos se evaluaron 20 caracteres cuantitativos y uno cualitativo (Cuadro 1); de ellos, nueve fueron publicados por Vázquez-García *et al.* (2001a). Cada carácter se evaluó en 14 individuos de cada variedad.

Análisis molecular ISSR

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de aproximadamente 100 mg de tejido fresco de hoja con el método denominado CTAB (Zhou *et al.*, 1999). El ADN fue resuspendido en 50 μ L de

Morphological analysis

To make the matrix of morphological data, 20 quantitative and one qualitative characters were evaluated (Table 1), nine of which were published by Vázquez-García *et al.* (2001a). Each character was evaluated in 14 individuals of each variety.

ISSR molecular analysis

DNA extraction

The genomic DNA was extracted from approximately 100 mg of fresh leaf tissue with the method known as CTAB (Zhou *et al.*, 1999). The DNA was re-suspended in 50 μ L of TE buffer (Tris-HCl EDTA) and stored at -20°C until ready for use.

Amplification by PCR (polymerase chain reaction) and electrophoresis of the DNA

The PCR was made in a final volume of 10 μ L with: 1 μ L of DNA (10 ng), 1 μ L of 10X PCR buffer with ammonia (15 mM), 0.5 μ L of MgCl_2 (15 mM), 1 μ L of dNTPs (10 mM) (APPLIED BIOSYSTEMS[®]), 1 μ L of the primer (20 μ M)

Cuadro 1. Caracteres morfológicos y datos estadísticos básicos de nueve variedades de *T. pavonia* (L.f.) DC.
Table 1. Morphological characters and basic statistical data of nine varieties of *T. pavonia* (L. f.) DC.

Carácter	Media	Máx.	Mín.	DE	CV (%)	p
1. Flores por brote (número)	9.32	17.00	3.00	2.22	23.23	<0.0753
2. Longitud del tépalo externo (cm)	8.65	11.70	7.00	0.88	7.87	<0.0001
3. Longitud del tépalo interno (cm)	4.42	5.20	3.70	0.31	6.60	<0.0004
4. Tipo de tépalo interno (ovalado, puntiagudo, lanceolado, redondeado)	1.92	4.00	1.00	1.23	22.72	<0.0001
5. Longitud de la columna estaminal (cm)	4.49	5.40	3.80	0.29	4.48	<0.0001
6. Distancia de la base de la antera al estigma (cm)	1.05	2.50	0.30	0.54	20.46	<0.0001
7. Longitud de la antera (cm)	1.59	2.00	1.00	0.21	7.40	<0.0001
8. Longitud de la parte reproductiva (cm)	6.31	7.30	5.10	0.49	4.42	<0.0001
9. Frutos por brote (número)	4.84	13.00	1.00	2.32	34.44	<0.0001
10. Brotes por bulbo (número)	4.00	6.00	3.00	0.98	18.64	<0.0001
11. Longitud de brote (cm)	60.03	96.50	38.60	18.68	7.03	<0.0001
12. Nudos por brote (número)	3.84	5.00	2.00	0.44	11.14	<0.0240
13. Longitud del entrenudo (cm)	8.18	22.00	0	6.15	39.24	<0.0001
14. Ramas por brote (número)	1.98	3.00	0.90	0.72	25.03	<0.0001
15. Longitud de hoja (cm)	34.13	46.00	16.00	6.78	8.23	<0.0001
16. Anchura de la hoja (cm)	3.53	5.60	2.50	0.88	7.46	<0.0001
17. Longitud del pseudopecíolo (cm)	7.55	11.00	6.00	1.32	6.16	<0.0001
18. Longitud del escapo floral (cm)	11.21	28.00	3.00	7.29	10.89	<0.0001
19. Grosor del escapo floral (cm)	0.55	1.00	0.30	0.22	6.33	<0.0001
20. Longitud de bráctea (cm)	11.29	24.50	8.00	3.88	16.60	<0.0001
21. Anchura de la bráctea (cm)	2.85	3.50	2.20	0.38	4.03	<0.0001

Los caracteres del 1-9 fueron documentados por Vázquez-García *et al.* (2001a). DE = desviación estándar; CV= coeficiente de variación
❖ Characters 1-9 were documented by Vázquez-García *et al.* (2001a). DE = standard deviation; CV = coefficient of variation

amortiguador TE (Tris-HCl EDTA) y almacenado a -20°C hasta su uso.

Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y electroforesis del ADN

La PCR se efectuó en un volumen final de $10\ \mu\text{L}$ con: $1\ \mu\text{L}$ de ADN (10 ng), $1\ \mu\text{L}$ de 10X amortiguador PCR con amonio (15 mM), $0.5\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 (15 mM), $1\ \mu\text{L}$ de dNTPs (10 mM) (APPLIED BIOSYSTEMS®), $1\ \mu\text{L}$ del iniciador (20 μM) (INVITROGEN™) y 0.1 unidades de la enzima Taq ADN polimerasa (MERCURY REAGENTS™). Se usaron cinco iniciadores de tipo microsatélites anclados (3'-ASSR) (Yamagishi *et al.*, 2002). En cada iniciador el ancla consistió en un triplete de secuencia distinta (Cuadro 2).

Las condiciones de amplificación para los iniciadores 3'-ASSR02 y 3'-ASSR15 fueron las descritas por Arzate-Fernández *et al.* (2005) y consistieron en un ciclo inicial de 9 min a 94°C , 1 min a 46°C y 1 min a 72°C , seguido por 45 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 46°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de 9 min a 94°C , 1 min a 46°C y 10 min a 72°C . Para los iniciadores 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 y 3'-ASSR35, los ciclos para la amplificación fueron los utilizados por Yamagishi *et al.* (2002) y consistieron en un ciclo inicial de 9 min a 94°C , seguido por 45 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 46°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C .

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador de gradiente Mastercycler (EPPENDORF®) modelo HAMBURG 22331. La separación de los fragmentos se realizó en cámaras de electroforesis horizontal, con geles de agarosa tipo II (SIGMA®) al 1 %, a los cuales se agregaron $3\ \mu\text{L}$ de bromuro de etidio (SIGMA®). Se usó un marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb (FERMENTAS™). Las condiciones de corrimiento para cada muestra fueron 100 V y 120 mA por 80 min, y la observación de los fragmentos se realizó en un transiluminador (UVP™) modelo MP20.

Cuadro 2. Características de los fragmentos ISSR amplificados en nueve variedades de *T. pavonia* (L.f.) DC: número de bandas totales (BT), número de bandas polimórficas (BP), porcentaje de bandas polimórficas (%P), poder de resolución (R_p), y tamaño de los fragmentos amplificados (TF) por cada iniciador ASSR.

Table 2. Characteristics of the ISSR fragments amplified in nine varieties of *T. pavonia* (L.f.) DC.: total number of bands (TB), number of polymorphic bands (PB), percentage of polymorphic bands (%P), resolution power (R_p), and size of the amplified fragments (FS) for each ASSR primer.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	BT	BP	%P	R_p	TF (pb)
3'-ASSR02	CTCTCTCTCTCTCT ATC	9	9	100	3.12	500-1300
3'-ASSR15	CTCTCTCTCTCTCT ATG	8	6	85.7	2.2	350-1200
3'-ASSR20	CTCTCTCTCTCTCT GCA	7	6	85.7	2.2	600-1800
3'-ASSR29	CTCTCTCTCTCTCT GTA	6	4	66.6	1.8	550-1400
3'-ASSR35	CTCTCTCTCTCTCT TGA	10	10	100	5.54	350-1900
Total		40	35	87.5	1.97	450

(INVITROGEN™) and 0.1 units of the enzyme Taq DNA polymerase (MERCURY REAGENTS™). Five primers of the anchored microsatellites type were used (3'-ASSR) (Yamagishi *et al.*, 2002). In each primer, the anchor consisted of a triplicate of distinct sequence (Table 2).

The amplification conditions for the primers 3'-ASSR02 and 3'-ASSR15 were those described by Arzate-Fernández *et al.* (2005), and consisted of an initial cycle of 9 min at 94°C , 1 min at 46°C and 1 min at 72°C and a final cycle of 9 min at 94°C , 1 min at 46°C and 10 min at 72°C . For primers 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 and 3'-ASSR35, the amplification cycles were those used by Yamagishi *et al.* (2002) and consisted of an initial cycle of 9 min at 94°C , 1 min at 46°C and 1 min at 72°C and a final cycle of 10 min at 72°C .

The amplification of the DNA fragments was made in a gradient thermocycler Mastercycler (EPPENDORF®) model HAMBURG 22331. The separation of the fragments was made in horizontal electrophoresis chambers, with type II agarose gels (SIGMA®) at 1 %, to which $3\ \mu\text{L}$ of ethidium bromide (SIGMA®) were added. A molecular marker of 100 to 3000 pb molecular weight (FERMENTAS™) was used. The running conditions for each sample were 100 V and 120 mA for 80 min, and the observation of the fragments was made in a transilluminator (UVP™) model MP20.

Statistical analysis

The 21 morphological characters were evaluated through an analysis of variance and a completely randomized design with 14 replicates, with the statistical program SAS version 8.0. With the data generated of the morphological characters, a binary matrix was made following the criteria described by Vicente and Fulton (2003); that is, the value of 1 was assigned if the character was present and 0 if it was absent.

For the ISSR molecular analysis, each band generated by each primer 3'-ASSR was considered as an independent locus

Análisis estadístico

Los 21 caracteres morfológicos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y un diseño completamente al azar con 14 repeticiones, con el programa estadístico SAS versión 8.0. Con los datos generados de los caracteres morfológicos, se elaboró una matriz binaria siguiendo el criterio descrito por Vicente y Fulton (2003); esto es, se asignó el valor 1 si el carácter estuvo presente y 0 si estuvo ausente.

Para el análisis molecular ISSR, cada banda generada por cada iniciador 3'-ASSR fue considerada como un locus independiente calculado manualmente; es decir, se asignó el valor 1 para la presencia de una banda y 0 para su ausencia. Únicamente las bandas con mayor claridad fueron usadas para el análisis.

El número total de bandas (BT), bandas polimórficas (BP) y porcentaje de bandas polimórficas (%P) fueron calculados usando el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh y Boyle, 1999). La capacidad de cada iniciador ASSR para diferenciar a las nueve variedades en estudio fue evaluada mediante el poder de resolución (R_p), según Prevost y Wilkinson (1999).

En ambos casos, para conocer las relaciones genéticas y cómo se agrupaban las variedades analizadas, se usó el método UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average, por sus siglas en inglés) basado en la matriz de distancia genética (D_c) de Nei (Nei, 1972), a partir de la cual se construyeron los dendrogramas usando el programa POPGENE.

Para calcular la correlación entre los marcadores morfológicos y moleculares ISSR, se hizo un análisis de correlación simple basado en las matrices de distancias genéticas, usando el programa STATGRAPHICS Plus versión 4.0.

Para conocer si la variación genética entre las nueve variedades evaluadas estaba relacionada con un gradiente altitudinal, se correlacionaron los valores de las distancias genéticas derivados del análisis morfológico y molecular, con los de la altitud geográfica correspondientes a cada una de las variedades de *T. pavonia*, para lo cual, se realizó un análisis de correlación usando el programa STATGRAPHICS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis morfológico

Los valores de la media, máximo, mínimo, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV), fueron calculados para cada uno de los 21 caracteres morfológicos evaluados en las nueve variedades (Cuadro 1). De acuerdo con los valores del CV, los caracteres número de flores por brote, tipo de tépalo interno, distancia de la base de la antera al estigma,

calculado manualmente; que es, el valor de 1 se asignó para la presencia de una banda y 0 para su ausencia. Solo las bandas con mayor claridad fueron usadas para el análisis.

El número total de bandas (TB), bandas polimórficas (PB) y porcentaje de bandas polimórficas (%P) fueron calculados usando el programa POPGENE versión 1.32 (Yeh y Boyle, 1999). La capacidad de cada ASSR primer para diferenciar a las nueve variedades en estudio fue evaluada mediante el poder de resolución (R_p), según Prevost y Wilkinson (1999).

En ambos casos, para conocer las relaciones genéticas y cómo se agrupaban las variedades analizadas, se usó el método UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) basado en la matriz de distancia genética (D_c) de Nei (Nei, 1972), a partir de la cual se construyeron los dendrogramas usando el programa POPGENE.

Para calcular la correlación entre los marcadores morfológicos y moleculares, se hizo un análisis de correlación simple basado en las matrices de distancias genéticas, usando el programa STATGRAPHICS Plus versión 4.0.

Para conocer si la variación genética entre las nueve variedades evaluadas estaba relacionada con un gradiente altitudinal, se correlacionaron los valores de las distancias genéticas derivados del análisis morfológico y molecular, con los de la altitud geográfica correspondientes a cada una de las variedades de *T. pavonia*, para lo cual, se realizó un análisis de correlación usando el programa STATGRAPHICS.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological analysis

The values of the mean, maximum, minimum, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated for each one of the 21 morphological characters evaluated in the nine varieties (Table 1). According to the values of the CV, the characters number of flowers per shoot, type of internal tepal, distance from the base of the anther to the stigma, number of fruits per shoot, length of the internode and number of branches per shoot showed a slightly high variation level. In contrast, the characters that presented low variation levels among the varieties were the length of the staminal column, length of the reproductive part and bract width.

The statistical analysis showed that the number of flowers per shoot and nodes per shoot were not significant. However, for the other 19 characters there were highly significant differences ($p \leq 0.0001$) (Table 1). These results show the high phenotypic diversity among the varieties analyzed, and can be

número de frutos por brote, longitud del entrenudo y número de ramas por brote mostraron un nivel de variación ligeramente alto. Por el contrario, los caracteres que presentaron niveles bajos de variación entre las variedades fueron la longitud de la columna estaminal, longitud de la parte reproductiva y anchura de la bráctea.

El análisis estadístico mostró que el número de flores por brote y de nudos por brote no fueron significativos. Sin embargo, para los 19 caracteres restantes hubo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.0001$) (Cuadro 1). Estos resultados muestran la alta diversidad fenotípica entre las variedades analizadas, y pueden ser usadas como características fenotípicas distintivas para la selección de líneas parentales dentro de un programa de mejoramiento.

Las variedades formaron dos grupos con base en sus caracteres morfológicos (Figura 1A). El grupo I con promedio de $D_G=0.42$ consistió de las variedades Carolina, Trinidad, Mariana, Ángeles, Sandra, Penélope y Dulce, mientras que en el grupo II estuvieron las variedades Gloria y Samaria, con un promedio de $D_G=0.32$.

Los caracteres morfológicos (18 de 21 iguales) mostraron la estrecha relación genética entre las variedades Trinidad y Mariana ($D_G = 0.28$). Por el contrario, las variedades menos emparentadas fueron

used for the selection of parental lines within a plant breeding program.

The varieties formed two groups based on their morphological characteristics (Figure 1A). Group I with average of $D_G=0.42$ consisted of the varieties Carolina, Trinidad, Mariana, Ángeles, Sandra, Penélope and Dulce, while group II included the varieties Gloria and Samaria, with an average of $D_G=0.32$.

The morphological characters (18 of 21 equal) showed the close genetic relationship between the varieties Trinidad and Mariana ($D_G=0.28$). In contrast, the least related varieties were Carolina and Samaria, as well as Penélope and Samaria ($D_G=0.80$), with 4 and 5 of 21 similar morphological characters, respectively.

According to Vázquez-García *et al.* (2001a), the varieties Gloria and Samaria can be easily distinguished by shoot length. In the present study, the results were similar and both varieties showed plant height, internode length, floral scapus length and length of major bract, as well as bract width.

ISSR molecular analysis

The total number of bands reproducible with the five ASSR primers was 40, with an interval of 350

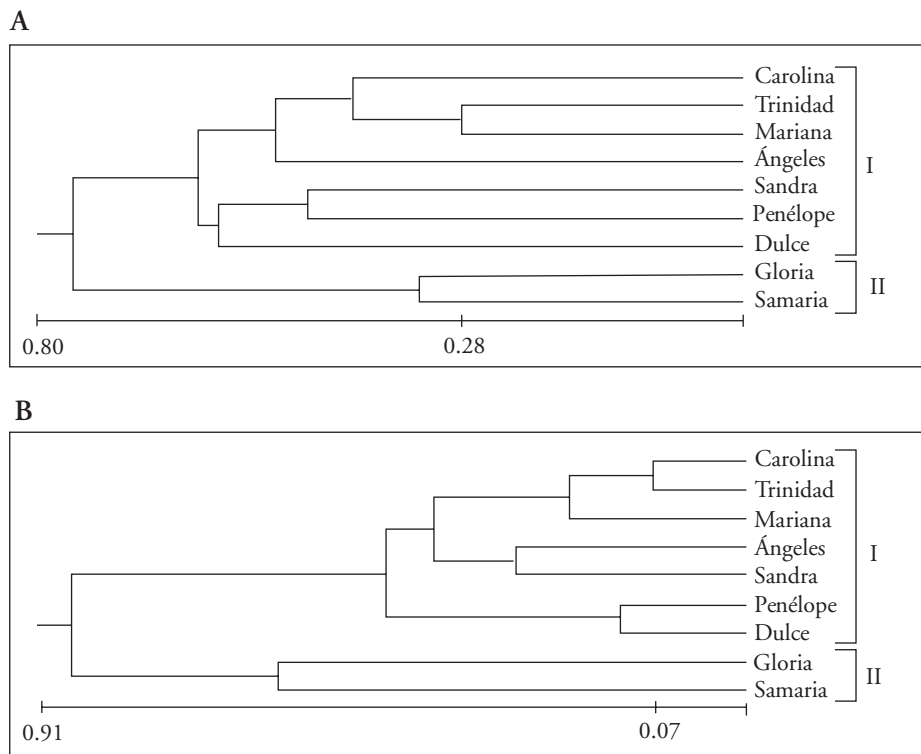


Figura 1. Dendrograma de nueve variedades de *T. pavonia* basado en la distancia genética de Nei (1972), con el método UPGMA. La barra indica la distancia genética entre las variedades y los grupos, calculada a partir de datos morfológicos (A), y datos moleculares ISSR (B).

Figure 1. Dendrogram of nine varieties of *T. pavonia* based on the genetic distance of Nei (1972), with the method UPGMA. The bar indicates the genetic distance among the varieties and the groups, calculated from morphological data (A), and ISSR molecular data (B).

Carolina y Samaria, así como Penélope y Samaria ($D_G=0.80$), con 4 y 5 de 21 caracteres morfológicos similares, respectivamente.

Según Vázquez-García *et al.* (2001a), las variedades Gloria y Samaria pueden ser fácilmente distinguidas por su longitud de brote. En el presente estudio, los resultados fueron similares y ambas variedades mostraron altura de planta, longitud del entrenudo, longitud del escape floral y longitud de bráctea mayor, así como la anchura de las brácteas.

Análisis molecular ISSR

El número total de bandas reproducibles con los cinco iniciadores ASSR fue 40, con un intervalo de 350 a 1900 pb en el tamaño de los fragmentos amplificados. De las 40 bandas, 35 fueron polimórficas, con un promedio de siete por iniciador. El porcentaje de bandas polimórficas varió del 66.6 al 100 %, con un promedio de 87.5 % (Cuadro 2). Estos resultados coinciden con lo reportado por Yamagishi *et al.* (2002) y Arzate-Fernández *et al.* (2005), quienes utilizaron estos iniciadores ASSR y comprobaron su eficiencia para detectar porcentaje de polimorfismo alto en diferentes especies del género *Lilium*.

Un aspecto que favorece la efectividad de los iniciadores ASSR además del tipo de la repetición motivo en su secuencia, es la secuencia de su ancla. Las secuencias motivo CT producen mayor polimorfismo en comparación con las repeticiones AT (Pradeep *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003), que, a pesar de ser las más abundantes en los genomas vegetales, tienen la desventaja de que la amplificación de fragmentos de ADN sea baja; esto puede deberse a la semi-complementariedad del iniciador en la etapa de alineación de la PCR (Fang y Roose, 1997). En esta investigación, el nivel de distinción entre las variedades dependió de la secuencia del ancla del iniciador. Así, fue posible obtener 100 % de polimorfismo entre las variedades de *T. pavonia* con los iniciadores ASSR02 y ASSR35 (Cuadro 2).

Prevost y Wilkinson (1999) describieron el poder de resolución (R_p) como una herramienta útil para evaluar la capacidad de un iniciador en la distinción de varios genotipos. En esta investigación, los valores más altos de R_p fueron para los iniciadores ASSR02 y ASSR35 (Cuadro 2), con los cuales se distinguieron una de otra, las nueve variedades. Escandón *et al.* (2005a) obtuvieron resultados similares sólo con

to 1900 pb in the size of the amplified fragments. Of the 40 bands, 35 were polymorphic, with an average of seven per primer. The percentage of polymorphic bands varied from 66.6 to 100%, with an average of 87.5% (Table 2). These results coincide with those reported by Yamagishi *et al.* (2002) and Arzate-Fernández *et al.* (2005), who used these ASSR primers and proved their efficiency for detecting percentage of high polymorphism in different species of the genus *Lilium*.

One aspect that favors the effectiveness of the ASSR primers as well as the type of the motive replicate in its sequence, is the sequence of its anchor. The CT motive sequences produce higher polymorphism with respect to the AT replicates (Pradeep *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003), which despite being the most abundant in the plant genomes, have the disadvantage that the amplification of DNA fragments is low; this may be due to the semi-complementarity of the primer in the alienation stage of the PCR (Fang and Roose, 1997). In this investigation, the level of distinction among the variables depended on the sequence of the anchor of the primer. Thus, it was possible to obtain 100% polymorphism among the varieties of *T. pavonia* with primers ASSR02 and ASSR35 (Table 2).

Prevost and Wilkinson (1999) described the resolution power (R_p) as a useful tool for evaluating the capacity of a primer in the distinction of various genotypes. In this investigation, the highest values of R_p were for the primers ASSR02 and ASSR35 (Table 2), with which the nine varieties were distinguished from each other. Escandón *et al.* (2005a) obtained similar results with just two ASSR primers and generated specific profiles for 18 of 21 collections of *Jacaranda mimosifolia*. The efficiency of the ASSR primers for discriminating genotypes in the inter-varietal level has also been reported in *Solanum tuberosum* (Prevost and Wilkinson, 1999), *Jacaranda mimosifolia* (Pérez de la Torre *et al.*, 2003), *Nierembergia linaeriefolia* (Escandón *et al.*, 2005b) and *Ficus carica* (Guasmi *et al.*, 2006), among others.

The dendrogram generated with the ISSR data (Figure 1B) formed two groups of varieties: group I included Carolina, Ángeles, Trinidad, Sandra, Dulce, Mariana and Penélope ($D_G=0.19$); in group II, Gloria and Samaria ($D_G=0.39$). The highest genetic association ($D_G=0.07$) was found between the varieties Carolina and Ángeles, while the least related were Gloria and Dulce ($D_G = 0.91$).

dos iniciadores ASSR y generaron perfiles específicos para 18 de 21 recolectas de *Jacaranda mimosifolia*. La eficiencia de los iniciadores ASSR para discriminar genotipos en el nivel inter-varietal también ha sido reportada en *Solanum tuberosum* (Prevost y Wilkinson, 1999), *Jacaranda mimosifolia* (Pérez de la Torre *et al.*, 2003), *Nierembergia linaeriefolia* (Escandón *et al.*, 2005b) y *Ficus carica* (Guasmi *et al.*, 2006), entre otros.

El dendograma generado con los datos ISSR (Figura 1B) formó dos grupos de variedades: en el grupo I se ubicaron Carolina, Ángeles, Trinidad, Sandra, Dulce, Mariana y Penélope ($D_G=0.19$); en el grupo II, Gloria y Samaria ($D_G=0.39$). La asociación genética mayor ($D_G=0.07$) se encontró entre las variedades Carolina y Ángeles, mientras que las menos emparentadas fueron Gloria y Dulce ($D_G=0.91$).

Correlación entre marcadores morfológicos y moleculares ISSR

El coeficiente de correlación entre las matrices de los marcadores morfológicos y moleculares ISSR fue 0.30 ($p \leq 0.1$). Esto indica una relación positiva de ambas variables en la diferenciación genética de las nueve variedades de *T. pavonia* analizadas. Algo similar mostraron los dendogramas con el agrupamiento de las mismas variedades en cada uno (Figura 1). Los análisis de los caracteres morfológicos e ISSR parecen más eficientes que el de isoenzimas utilizado por Arzate-Fernández *et al.* (2008) para caracterizar nueve variedades de *T. pavonia* y con el que sólo diferenciaron cinco de las nueve variedades evaluadas.

La correlación positiva también indica que los marcadores morfológicos pueden proveer una medida de la diversidad genética entre las variedades. Sin embargo, a pesar de que los promedios de D_G calculados con los caracteres morfológicos (0.54) (Figura 1 A) e ISSR (0.49) (Figura 1B) indican que los primeros tienen un valor ligeramente más alto para detectar la variabilidad genética, la amplitud de D_G para los marcadores ISSR fue mayor. Esto permite asegurar la diferencia entre los individuos con una metodología relativamente rápida y sencilla como es el uso de ISSR. Tapia *et al.* (2005a; 2005b) y Geleta *et al.* (2006) también observaron una mayor eficiencia de los marcadores ISSR, respecto a los morfológicos, para discriminar genotipos de *Ananas comosus* L., *Citrus reticulata* L., y *Sorghum vulgare* Pers.

Correlation ISSR molecular and morphological markers

The coefficients of correlation among the matrices of the morphological and ISSR molecular markers was 0.30 ($p \leq 0.1$). This indicates a positive relationship of both variables in the genetic differentiation of the nine varieties of *T. pavonia* analyzed. Something similar was shown by the dendograms with the grouping of the same varieties in each one (Figure 1). The analyses of the morphological and ISSR characters seem to be more efficient than that of isoenzymes used by Arzate-Fernández *et al.* (2008) for characterizing nine varieties of *T. pavonia* and with which only five of the nine varieties evaluated were distinguished.

The positive correlation also indicates that the morphological markers can provide a measure of genetic diversity among the varieties. However, although the averages of D_G calculated with the morphological characters (0.54) (Figure 1 A) and ISSR (0.49) (Figure 1B) indicate that the morphological characters have a slightly higher value for detecting genetic variability, the amplitude of D_G for the ISSR markers was higher. This makes it possible to confirm the difference among the individuals with a method that is relatively fast and simple such as the use of ISSR. Tapia *et al.* (2005a; 2005b) and Geleta *et al.* (2006) also observed a higher efficiency of the ISSR marker with respect to the morphological ones, to discriminate genotypes of *Ananas comosus* L., *Citrus reticulata* L., and *Sorghum vulgare* Pers.

Correlation between genetic distance and geographic altitude

According to Wen and Hsiao (2001), the genetic differentiation in populations of *Lilium longiflorum* is correlated with altitude; in the lower altitude, the similarity among individuals is higher, and vice-versa. Arzate-Fernández *et al.* (2005) evaluated the genetic diversity in two populations of *L. maculatum* and found that the populations developed in altitudes of 1000 m presented greater genetic variation than those that grew at 650 m. In the present investigation it was also possible to establish a positive and statistically significant correlation ($p \leq 0.001$) between genetic variation and geographic altitude of the varieties of *T. pavonia* evaluated (Figure 2). With both analyses, the

Correlación entre distancia genética y altitud geográfica

De acuerdo con Wen y Hsiao (2001), la diferenciación genética en poblaciones de *Lilium longiflorum* está correlacionada con la altitud; a menor altitud mayor es la similitud entre individuos y viceversa. Arzate-Fernández *et al.* (2005) evaluaron la diversidad genética en dos poblaciones de *L. maculatum* y encontraron que las poblaciones desarrolladas en altitudes de 1000 m presentaron mayor variación genética que los que crecían a 650 m. En la presente investigación también fue posible establecer una correlación positiva y estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) entre la variación genética y la altitud geográfica de las variedades de *T. pavonia* evaluadas (Figura 2). Con ambos análisis, las variedades se ubicaron según su origen geográfico, lo cual coincidió con los dos grupos principales en los respectivos dendrogramas.

En ambos dendrogramas el grupo I siempre incluyó a la variedad Sandra, recolectada en Tenancingo (2100 m) y las recolectadas en Temascaltepec (2250 m), mientras que en el grupo II permanecieron juntas las variedades Gloria y Samaria, recolectadas en Temoaya (2600 m).

Lesica y Allendorf (1995, citados por Ohsawa e Ide, 2007) mencionan que las poblaciones entre dos límites geográficos experimentan mayor intercambio de genes, mientras que entre las poblaciones periféricas, hay flujo limitado de genes. La diferencia en la altitud de origen de las poblaciones se relaciona con una marcada diferencia en la fenología de cada especie, específicamente en la floración y la fructificación; ambas fases se retardan en altitudes mayores (Jordano y Godoy, 2000). En concordancia con esto, en el presente estudio se observó que la floración de las variedades Samaria y Gloria fue la más tardía y los sitios de recolecta pueden haber causado ese efecto. Similarmente la variedad Sandra, recolectada a 2100 m, estuvo relacionada cercanamente al grupo recolectado a 2250 m y no al recolectado a 2600 m.

CONCLUSIONES

Los marcadores morfológicos y los de tipo ISSR muestran polimorfismo entre las nueve variedades de *T. pavonia* obtenidas en un gradiente altitudinal, y permiten la distinción entre ellas con el uso de los iniciadores 3'-ASSR02 y 3'-ASSR35.

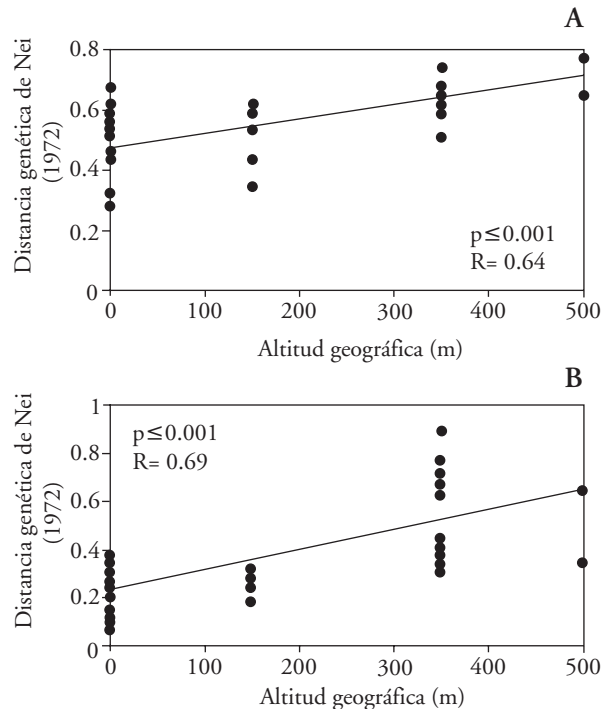


Figura 2. Correlación entre la distancia genética y la altitud de recolecta de nueve variedades de *T. pavonia*. (A) Análisis con caracteres morfológicos y (B) moleculares ISSR.

Figure 2. Correlation between genetic distance and collection altitude of nine varieties of *T. pavonia*. (A) Analysis with morphological characters and (B) ISSR molecular characters.

varieties were located according to their geographic origin, which coincided with the two principal groups in the respective dendrograms.

In both dendrograms group I always included the Sandra variety, collected in Tenancingo (2100 m) and those collected in Temascaltepec (2250 m), while in group II the varieties Gloria and Samaria, collected in Temoaya (2600 m), remained together.

Lesica and Allendorf (1995, cited by Ohsawa and Ide, 2007) mention that the populations between two geographic limits experiment higher exchange of genes, whereas among the peripheral populations, there is a limited gene flow. The difference in the altitude of origin of the populations is related to a marked difference in the phenology of each species, specifically in flowering and fructification; both phases are retarded in higher altitudes (Jordano and Godoy, 2000). In concordance with these findings, in the present study it was observed that the flowering of the varieties Samaria and Gloria was the latest and the collection sites may have caused this effect.

La relación genética entre las variedades fue visualizada con los dendrogramas generados con caracteres morfológicos, moleculares, y el análisis de correlación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al Ing. José Luis Piña Escutia, Proyecto No. 52936 así como a la Universidad Autónoma del Estado de México, Proyecto No. 2106/2005. Por último, a la Q.F.B. Ana Isabel Quintana Carapia, por su valioso apoyo logístico.

LITERATURA CITADA

- Adugna, W., M. T. Labuschagne, and C. D. Viljoen. 2006. The use of morphological and AFLP markers in diversity analysis of linseed. *Biodiversity and Conservation* 15: 3193-3205.
- Arzate-Fernández, A. M., M. Miwa, T. Shimada, T. Tonekura, and K. Ogawa. 2005. Genetic diversity of miyamasukashiyuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. Bukosanense), an endemic endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biol.* 20: 57-65.
- Arzate-Fernández, A. M., A. Hoyos-Basurto, L. M. Vázquez-García y M. G. Gutiérrez-Martínez. 2008. Caracterización isoenzimática de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 42: 519-528.
- Escandón, A., M. Pérez de la Torre, A. Acevedo, S. Marucci-Poltri, and I. Mijayima. 2005a. Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. *Acta Horticulturae* 683: 121-127.
- Escandón A., M. Pérez de la Torre, M. S. Soto, y N. Zelener. 2005b. Identificación de clones selectos de *Nierembergia linearifolia* mediante microsatélites anclados. *Rev. Inv. Agror. INTA. Argentina* 34 (1): 5-17.
- Fang, D. Q., and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
- Geleta, N., M. T. Labuschagne, and C. D. Viljoen. 2006. Genetic diversity analysis in sorghum germplasm as estimated by AFLP, SSR and morpho-agronomical markers. *Biodiversity and Conservation* 15: 3251-3265.
- Guasmi, F., A. Ferchichi, K. Farés, and L. Touil. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using Inter simple sequence repeat markers. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (15): 1370-1374.
- Hu, J., M. Nakatani, L. A. García, T. Kuranouchi, and T. Fujimura. 2003. Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Sci.* 53: 297-304.
- Hernández F. 1959. Historia natural de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México. Tomo II. Vol. I. 476 p.
- Jordano, P., and J. A. Godoy. 2000. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Molecular Ecol.* 9: 1293-1305.
- Similarly, the Sandra variety, collected at 2100 m, was closely related to the group collected at 2250 m and not to the one collected at 2600 m.

CONCLUSIONS

The morphological markers and those of ISSR show polymorphism among the nine varieties of *T. pavonia* obtained in an altitudinal gradient, and permit the distinction among them with the use of primers 3'-ASSR02 and 3'-ASSR35.

The genetic relationship among the varieties was visualized with the dendrograms generated with morphological and molecular characters, along with the analysis of correlation.

—End of the English version—



- Nei M. 1972. Original measures of genetic identity and genetic distance genetic. *Am. Naturalist* 106: 283-292.
- Ohsawa, T., and Y. Ide. 2007. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecol. Biogeography* 1-12.
- Pérez de la Torre M., A. Acevedo, J. C. Serpa, I. Mijayima, y A. S. Escandón. 2003. Puesta a punto de la técnica de microsatélites anclados para la caracterización de individuos selectos de jacaranda. *In: Mascarini, L., F. Vilella., and E. Wright (eds). Floricultura en la Argentina. Inv. Tecnol. Prod.* 3-12.
- Pradeep, R. M., N. Sarla, and E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Prevost, A., and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprint of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Rodríguez, A., and K. J. Sytsma. 2005. Phylogenetics of the "tiger flower" group (*Tigridieae: Iridaceae*): molecular and morphological evidence. *Aliso* 22 (1): 412-424.
- Suslow, T. V., B. R. Thomas, and K. J. Bradford. 2005. Biotechnology provides new tools for plant breeding. *Agric. Biotechnol. California Series. Publication* 8043. pp: 1-19.
- Tapia C. E., A. H. Guillén, y E. M. A. Gutiérrez. 2005a. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. *Fitotec. Mex.* 28 (3): 187-194.
- Tapia, C. E., E. M. A. Gutiérrez, M. L. Warburton, V. A. Santacruz, and M. A. Villegas. 2005b. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia* 30 (11): 687-693.
- Valadez-Moctezuma E., G. Kahl, J. Ramser, B. Hüttel, y A. Rublío-Islas. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Fitotec. Mex.* 24(1): 103-120.
- Vázquez-García, L. M., A. A. Przybyla, T. E. De la Cruz, N. H. Torres, and G. Rodríguez. 2001a. Morphological description

- of nine botanical varieties of *Tigridia pavonia* (L.F.) Ker. Gawl. J. Appl. Bot. 75: 14-19.
- Vázquez-García L. M., T. H. Norman M., y M. del C. Corona R. 2001b. Oceloxochitl *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Colección: Ciencias Naturales y Exactas, Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. 69 p.
- Vicente M. C., y T. Fulton. 2003. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. Illus. Nelly Giraldo. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. 1:1-52.
- Wen, C. S., and J. Y. Hsiao. 2001. Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var. *Formosanum*; *Liliaceae*) using RAPD markers and morphological characters. Int. J. Plant Sci. 162(2): 287-295.
- Yamagishi, M., H. Abe, M. Nakano, and A. Nakatsuka. 2002. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. Scientia Horticulturae 96: 225-234.
- Yeh, F. C., and T. J. B. Boyle. 1999. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. Belgium J. Bot. 129: 157.
- Zhou, Z., M. Miwa, and T. Hogetsu. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaemferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytol. 144: 55-63.