

CARACTERIZACIÓN DEL LIRIO AZTECA MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

CHARACTERIZATION OF AZTEC LILY THROUGH MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS

M. Deneb Bautista-Puga¹, L. Miguel Vázquez-García¹, Helena Leszczynska-Borys²,
Michał W. Borys², Amaury M. Arzate-Fernández^{1*}

¹Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario "El Cerrillo", Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5 entronque al Cerrillo. 50200. Toluca, México. (amaury1963@yahoo.com.mx). ²Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Centro de Investigación en Plantas Nativas. 21 Sur 1103, Colonia Santiago, 72160. Puebla, Puebla.

RESUMEN

El lirio azteca [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] es una especie endémica de México. Su color rojo escarlata y la forma de su flor le confieren un gran potencial para usarse como planta ornamental y como flor de corte, flor en maceta y paisajismo. Por tanto, cuatro variedades botánicas de *S. formosissima* fueron evaluadas mediante 29 descriptores varietales y cinco iniciadores anclados (ASSR), con el propósito de conocer la eficiencia de cada uno de los marcadores en la diferenciación de variedades de *S. formosissima* y, además, determinar la posible relación entre la variabilidad genética y la altitud geográfica de recolecta de las cuatro variedades de *S. formosissima*. Los iniciadores ASSR generaron 57 a 100 % de polimorfismo. Con tres de los cinco iniciadores fue posible distinguir cada una de las variedades entre sí, generando un perfil molecular para su identificación inequívoca. Los ASSR fueron más eficientes al detectar una mayor variabilidad genética ($D_c=0.5$) con respecto a los morfológicos ($D_c=0.3$). La correlación basada entre la distancia genética y la altitud para el análisis morfológico no fue significativa; además, el análisis molecular no mostró una correlación entre ambos factores.

Palabras clave: *Sprekelia formosissima*, ASSR, marcadores morfológicos, variabilidad genética.

INTRODUCCIÓN

El lirio azteca [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] forma parte del grupo de plantas bulbosas ornamentales más hermosas de México, la

ABSTRACT

Aztec lily [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] is a species native to México. The scarlet color and shape of its flowers gives it great potential for use as an ornamental plant and as cut flower, potted flower and landscaping. Therefore, we evaluated four botanical varieties of *S. formosissima* using 29 varietal descriptors and five anchored primers (ASSR), in order to learn about the efficiency of each of the markers in the differentiation of varieties of *S. formosissima*, and also determine the possible relationship between the genetic variability and geographical altitude of collection of such varieties. The ASSR primers generated 57 to 100 % polymorphism. With three of the five primers we could distinguish each one of the varieties, generating a molecular profile for unambiguous identification. The ASSR were more efficient when detecting a greater genetic variability ($D_c=0.5$) with respect to the morphological ones ($D_c=0.3$). The correlation between genetic distance and altitude for morphological analysis showed to be not significant; likewise, the molecular analysis did not show a correlation between both factors.

Key words: *Sprekelia formosissima*, ASSR, morphological markers, genetic variability.

INTRODUCTION

Aztec lily [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] is part of the group of the most beautiful ornamental bulbous plants in México, and had great importance as a medicinal plant (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995). It is a wild herb consistency plant belonging to the Amaryllidaceae

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Julio, 2010. Aprobado: Mayo, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 413-422. 2011.

cual tuvo una gran importancia como planta medicinal (Leszczyńska-Borys *et al.*, 1995). Es una planta silvestre de consistencia herbácea que pertenece a la familia Amaryllidaceae y es endémica de México. Su color rojo escarlata y la forma de su flor le confiere un gran potencial para usarse como planta ornamental y como flor de corte, flor en maceta y paisajismo (Leszczyńska-Borys y Borys, 2001). Esto puede favorecer la proliferación de nuevos cultivares, para los cuales no se cuenta con un mecanismo eficiente de caracterización que permita evitar posibles confusiones en su nomenclatura.

Debido a la importancia de *S. formosissima*, Borys *et al.* (2005) realizaron una descripción taxonómica de la especie, pero puede contener información imprecisa porque está basado en características morfológicas altamente influenciadas por el ambiente (Vidal-Barahona *et al.*, 2006). Así, una correcta identificación de la especie vegetal es la base para determinar su uso y conservación; por tanto, la caracterización morfológica puede ser complementada con una caracterización molecular para reforzar la información de los estudios taxonómicos.

Mediante biología molecular se han desarrollado métodos para la identificación y caracterización de cultivares mediante marcadores de ADN para los análisis genéticos, así como para los programas de mejoramiento, debido a su simplicidad y facilidad de manejo (Tapia *et al.*, 2005a). Este tipo de marcadores se pueden evaluar desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, aplicables a cualquier tipo de material vegetal, sin necesidad de evaluar muchos caracteres y además libres de los efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado, 2006). Varios marcadores moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Tapia *et al.*, 2005a), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Martínez *et al.*, 2003), SSR (Simple Sequence Repeats; Valdenice *et al.*, 2006), e ISSR (Inter-simple Sequence Repeats; Tapia *et al.*, 2005a) se usan para detectar diversidad genética en nivel intra o inter-específico en plantas domesticadas y silvestres (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001). La técnica ISSR amplifica regiones genómicas entre dos microsatélites con iniciadores de tipo ASSR (Anchored Simple Sequence Repeat) (Yamagishi *et al.*, 2002). Además, esta técnica es superior respecto a los otros tipos de marcadores debido a su rapidez, alta reproducibilidad y mayor eficiencia para detectar polimorfismos (Pradeep *et al.*, 2002).

family and is endemic to México. Its red scarlet color and the shape of its flowers gives it great potential for use as an ornamental plant and as cut flowers, potted flowers and landscaping (Leszczyńska-Borys and Borys, 2001). This can lead to the proliferation of new cultivars, for which there is no efficient mechanism of characterization so as to avoid possible confusion in nomenclature.

Due to the importance of *S. formosissima*, Borys *et al.* (2005) undertook a taxonomic description of the species, but it may contain inaccurate information because it is based on morphological characteristics that are highly influenced by the environment (Vidal-Barahona *et al.*, 2006). Thus, having the correct identification of the plant species is the basis to determine its use and conservation; therefore, the morphological characterization can be supplemented with a molecular description to enhance taxonomic information.

Through molecular biology, methods have been developed for the identification and characterization of cultivars by using DNA markers for genetic analysis and for breeding programs due to their simplicity and ease of use (Tapia *et al.*, 2005a). Such markers can be assessed from the early stages of seedling development, and are applicable to any type of plant material without the need to evaluate many characters and, besides, free from epistatic effects (Azofeifa-Delgado, 2006). Several molecular markers such as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Tapia *et al.*, 2005a), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Martínez *et al.*, 2003), SSR (Simple Sequence Repeats; Valdenice *et al.*, 2006), and ISSR (Inter-simple Sequence Repeats; Tapia *et al.*, 2005a) are used to detect genetic diversity at intra- or inter-specific level in domesticated and wild plants (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001). The ISSR technique amplifies genomic regions between two microsatellites with ASSR (Anchored Simple Sequence Repeat) type primers (Yamagishi *et al.*, 2002). Moreover, this technique is superior compared to other types of markers due to its speed, high reproducibility and greater efficiency in detecting polymorphisms (Pradeep *et al.*, 2002).

Genetic variability is the genetic load expressed or not by the individuals of a species, whose function is to maintain a reservoir of conditions of variable response to the environment allowing for adaptation and survival of the species. When the genetic

La variabilidad genética es la carga genética expresada o no de los individuos de una especie, donde su función es mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio que permita la adaptación y supervivencia de la especie. Cuando la estructura genética está fuertemente influenciada por la distribución geográfica de las poblaciones, se espera que las poblaciones más cercanas presenten menor variabilidad que las más alejadas geográficamente (Wen y Hsiao, 2001). Borys *et al.* (2005) describieron morfológicamente el lirio azteca, pero no hay reportes sobre su caracterización molecular.

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar cuatro variedades botánicas de *S. formosissima* a través de marcadores morfológicos y moleculares (ISSR) y evaluar la eficiencia de cada uno de los marcadores en la diferenciación de las variedades de *S. formosissima*. Además determinar la posible relación entre la variabilidad genética y la altitud geográfica de recolecta de las cuatro variedades de *S. formosissima*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se evaluaron cuatro variedades botánicas de *S. formosissima* recolectadas en tres localidades del Estado de México, con registro ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). La variedad Oasis (SPK-001-240708) en Malinalco (1950 m), Andrea (SPK-002-240708) en Chapingo (2238 m), Terciopelo (Registro provisional número 1684-SPK-01-101204/C) en Villa Victoria (2600 m) y Julia (SPK-003-240708) en Valsequillo, Estado de Puebla (2160 m).

Análisis morfológico

Para el análisis morfológico se tomaron en cuenta los descriptors varietales aplicados a cada una de las variedades de *S. formosissima*, donde se evaluaron 29 características morfológicas con 81 variantes (Cuadro 1), según la Guía Técnica para la Descripción Varietal del lirio azteca [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] (SNICS, 2003).

Análisis molecular

Se extrajo ADN genómico de aproximadamente 100 mg de tejido fresco de hoja mediante el método de bromuro hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Zhou *et al.* 1999). El ADN fue resuspendido

structure is strongly influenced by the geographical distribution of populations, the closer populations are expected to present less variability than those that are geographically farther apart from one another (Wen and Hsiao, 2001). Borys *et al.* (2005) conducted a morphological description of Aztec lily, but there are no reports on its molecular characterization.

Therefore, the objective of this research was to characterize four botanical varieties of *S. formosissima* through morphological and molecular markers (ISSR) and evaluate the efficiency of each of the markers in the differentiation of varieties of *S. formosissima*. Besides, to determine the possible relationship between genetic variability and the geographical altitude of collection of the four varieties of *S. formosissima*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

We evaluated four botanical varieties of *S. formosissima* collected in three localities of the Estado de México, with registration with the Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (National Seed Inspection and Certification Service). The varieties were: Oasis (SPK-001-240708) in Malinalco (1950 m), Andrea (SPK-002-240708) in Chapingo (2238 m), Terciopelo (Provisional registration number 1684-SPK-01-101204/C) in Villa Victoria (2600 m) and Julia (SPK-003-240708) in Valsequillo, State of Puebla (2160 m).

Morphological analysis

In the morphological analysis we considered the varietal descriptors applied to each of the varieties of *S. formosissima*, and evaluated 29 morphological characteristics with 81 variants (Table 1), according to the Technical Guide for the Varietal Description of the Aztec lily [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert] (SNICS, 2003).

Molecular analysis

We extracted genomic DNA from approximately 100 mg fresh leaf tissue using the method of hexadecyltrimethylammonium bromide (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 use. The varieties were analyzed with ISSR markers and five 3'-ASSR anchored primers (Table 2). We performed DNA amplification by PCR with a Mastercycler gradient thermocycler

Cuadro 1. Características morfológicas de cuatro variedades de *S. formosissima*.
Table 1. Morphological characteristics of four varieties of *S. formosissima*.

No.	Rasgo	Oasis	Terciopelo	Andrea	Julia
1	Bulbo: forma	Alargado	Globoso	Globoso	Globoso
2	Bulbo: color	Café oscuro	Café oscuro	Café oscuro	Café oscuro
3	Bulbo: tamaño	Medio	Medio	Medio	Grande
4	Hoja: número	Medio	Medio	Abundante	Abundante
5	Hoja: largo	Media	Media	Media	Larga
6	Hoja: grosor (ancho)	Media	Media	Estrecha	Gruesa
7	Hoja: forma: corte transversal	Cóncava	Arqueada	Cóncava	Cóncava
8	Hoja: color	Verde claro	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro
9	Escapo: largo	Corto	Medio	Largo	Largo
10	Escapo: grosor: parte media del escapo	Estrecho	Medio	Medio	Grueso
11	Escapo: coloración antocianínica: a la apertura total de la flor	Presente	Presente	Presente	Presente
12	Flor: ángulo con respecto al escapo	90°	90°	90°	90°
13	Flor: número por bulbo	Una	Una	Tres o más	Tres o más
14	Flor: tamaño	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
15	Flor: forma	Simétrica	Simétrica	Simétrica	Simétrica
16	Flor: nervadura central o columnela del tépalo 1	Presente	Presente	Presente	Presente
17	Flor: nervadura central del tépalo 1 (presente): largo	Media	Media	Media	Media
18	Flor: bordes blancos de los tépalos 1, 3 y 5	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
19	Flor: bordes de los tépalos	Liso	Ondulado	Liso	Liso
20	Flor: tépalo 1: eje longitudinal	Recto	Incurvado	Incurvado	Incurvado
21	Flor: tépalo 2 y 6	Curvados simétricos	Curvados simétricos	Curvados simétricos	Curvados simétricos
22	Flor: garganta color	Blanco verdoso	Blanco verdoso	Blanco verdoso	Blanco verdoso
23	Pedúnculo: longitud	Medio	Medio	Corto	Medio
24	Pedúnculo: grosor	Medio	Medio	Estrecho	Medio
25	Estambre: largo	Medio	Medio	Largo	Largo
26	Estambre: porcentaje de coloración roja	75 %	75 %	75 %	75 %
27	Antera: color antes de la dehiscencia	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
28	Pistilo: porcentaje de la coloración roja	75 %	75 %	100 %	100 %
29	Estigma: tamaño	Medio	Medio	Medio	Pequeño

en 50 μL de amortiguador TE (Tris-HCl EDTA) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Las variedades se analizaron con los marcadores de ISSR y cinco iniciadores anclados 3'-ASSR (Cuadro 2). La amplificación del ADN mediante PC se realizó en un termociclador de gradiente Mastercycler (EPPENDORF®) modelo Hamburg 22331. La PCR se efectuó en un volumen final de 10 μL de solución que contenía 1 μL de amortiguador 10X PCR con amonio (15 mM), 0.5 μL de MgCl_2 (25 mM), 1 μL de dNTPs (10 mM mezcla) (APPLIED BIOSYSTEMS®), 0.1 μL de Taq ADN polimerasa (MERCURY REAGENTS™), 0.1 μL de iniciador (20 μM) (INVITROGEN™) y 1 μL de ADN genómico (10 ng μL^{-1}). La amplificación consistió de un ciclo inicial de 7 min a 94°C , seguido por 45 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 48°C , 1 min a 72°C , más un ciclo final de 5 min a 72°C . Los

(EPPENDORF®) 22331 Hamburg model. The PCR was performed in a final volume of 10 μL of solution containing 1 μL of 10X PCR buffer with ammonium (15 mM), 0.5 μL MgCl_2 (25 mM), 1 μL dNTPs (10 mM mixture) (APPLIED BIOSYSTEMS®), 0.1 μL of Taq DNA polymerase (MERCURY REAGENTS™), 0.1 μL of primer (20 μM) (INVITROGEN™) and 1 μL of genomic DNA (10 ng μL^{-1}). Amplification consisted of an initial cycle of 7 min at 94°C , followed by 45 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 48°C , 1 min at 72°C plus a final cycle of 5 min at 72°C . Amplified products were separated by electrophoresis on agarose gel Type II (SIGMA®) at 1 % in 1X TAE buffer with 3 μL of ethidium bromide (SIGMA®). The amplified bands were observed and photographed with a Transilluminator (UVP™) MP20 model.

Cuadro 2. Polimorfismo de fragmentos amplificados con cinco iniciadores ASSR en cuatro variedades de *S. formosissima*. Bandas totales (BT), bandas polimórficas (BP), bandas específicas (BG), % de polimorfismo (% P).

Table 2. Amplified fragment polymorphism with five ASSR primers in four varieties of *S. formosissima*. Total bands (BT), polymorphic bands (BP), specific bands (BE), % of polymorphism (% P).

Iniciador*	Secuencia	BT	BP	BE	%P
3'-ASSR02	5'-(CT) ₇ -ATC-3'	5	3	2	60
3'-ASSR15	5'-(CT) ₇ -ATG-3'	9	9	2	100
3'-ASSR20	5'-(CT) ₇ -GCA-3'	8	6	2	75
3'-ASSR29	5'-(CT) ₇ -GTA-3'	7	4	3	57
3'-ASSR35	5'-(CT) ₇ -TGA-3'	8	6	2	75
Promedio		7.4	5.6	2.2	73.4
Total		37	28	11	

*Yamagishi *et al.* (2002).

productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa Tipo II (SIGMA®) al 1 % en amortiguador TAE 1X con 3 µL de bromuro de etidio (SIGMA®). Las bandas amplificadas se observaron y fotografiaron en un Transiluminador (UVP™) modelo MP20.

Análisis estadístico

Con los datos derivados del análisis morfológico y molecular de cada variedad se formó una matriz binaria, en la cual la presencia de la banda/carácter se registró como 1 y la ausencia como 0 (Nei, 1972). Con el programa POPGENE 32 (Yeh y Boyle, 1999) se estimó la distancia genética, derivándose los dendrogramas. Con el fin de determinar la posible relación entre la variabilidad genética y la altitud geográfica de cada variedad se correlacionaron los valores obtenidos de la distancia genética tanto del análisis morfológico y molecular, mediante un análisis de correlación con el programa STATGRAPHICS Plus 4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis morfológico

De la matriz de distancias genéticas (D_G) obtenida del análisis morfológico se derivó el dendrograma (Figura 1A), que muestra la formación de dos grupos. En el grupo I se ubicaron las variedades Oasis y Terciopelo, y en el grupo II las variedades Andrea y Julia. La matriz de D_G mostró que las variedades con mayor similitud genética fueron: Andrea y Julia ($D_G=0.19$),

Statistical analysis

With data derived from morphological and molecular analysis of each variety we created a binary matrix in which the presence of the band/character was recorded as 1 and absence as 0 (Nei, 1972). With the program POPGENE 32 (Yeh and Boyle, 1999) we estimated the genetic distance, obtaining the dendrograms. To determine the possible relationship between genetic variability and geographical altitude of each variety we correlated the values obtained of genetic distance from both the morphological and molecular analyses by using a correlation analysis with the program STATGRAPHICS Plus 4.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological analysis

Of the matrix of genetic distances (D_G) derived from morphological analysis we obtained the dendrogram (Figure 1A), which revealed the formation of two groups. In group I the Oasis and Terciopelo varieties were located, and in group II Andrea and Julia. The D_G matrix showed that varieties with higher genetic similarity were: Andrea and Julia ($D_G=0.19$); both shared the largest number of common traits 23/29 (79 %), which probably could explain their genetic closeness. In contrast, the least related varieties were Oasis and Julia ($D_G=0.42$), which shared less morphological traits 16/29 (55 %) and were more distant in the dendrogram.

Molecular analysis

With PCR products we generated the condition of character presence (1) and absence (0) and a dendrogram (Figure 1B), where the formation of two groups was observed. Group I only included the variety Oasis, while Terciopelo, Julia and Andrea were located in group II. Of the D_G matrix (data not shown) the least related varieties ($D_G=0.66$) were Oasis and Terciopelo, but the most closely related genetically ($D_G=0.35$) were Terciopelo and Julia. We detected 37 bands of which 28 (73.4 %) were polymorphic (Table 2), amplified in a range of 300 to 1500 bp (Table 3). The primer with 100 % polymorphism was 3'-ASSR15. It should be noted that the five primers generated 11 specific bands in all varieties, which enabled to describe a molecular profile, and achieve a clear identification of the four

ambas comparten el número mayor de caracteres comunes 23/29 (79 %), lo cual probablemente pueda explicar su cercanía genética. En contraste, las variedades menos emparentadas fueron Oasis y Julia ($D_G=0.42$), las cuales compartieron menos rasgos morfológicos 16/29 (55 %) y aparecen más distantes en el dendrograma.

Análisis molecular

Con los productos de PCR se generaron los estados de carácter presencia (1) y ausencia (0) y se produjo un dendrograma (Figura 1B) donde se observa la formación de dos grupos. En el grupo I se ubicó sólo la variedad Oasis, mientras que en el grupo II están Terciopelo, Julia y Andrea. De la matriz de D_G (datos no mostrados) las variedades menos emparentadas ($D_G=0.66$) fueron Oasis y Terciopelo, pero las más emparentadas genéticamente ($D_G=0.35$) fueron Terciopelo y Julia. Se detectaron 37 bandas, de las cuales 28 (73.4 %) fueron polimórficas (Cuadro 2), amplificadas en un intervalo de 300 a 1500 pb (Cuadro 3). El iniciador con 100 % de polimorfismo fue 3'-ASSR15. Cabe señalar que los cinco iniciadores generaron 11 bandas específicas en todas las

variedades evaluadas. All varieties showed different specific bands: Oasis with 5, Terciopelo 3, Julia 2, and Andrea 1 (Table 3). The ASSR primers have proved to be effective to generate reliable information and distinguish individuals genetically related in domesticated and ornamental species. For example, in *Solanum tuberosum* (Prevost and Wilkinson, 1999), *Nierembergia lanariaefolia* (Escandon *et al.*, 2005), *Lilium* spp. (Yamagishi *et al.*, 2002, Arzate-Fernández *et al.*, 2005), and *Ananas* spp. (Tapia *et al.*, 2005a).

Pradeep *et al.* (2002) and Hu *et al.* (2003) note that the effectiveness of the ASSR primers is possibly due to the sequence motif and its anchor, where a CT sequence has a higher polymorphism with respect to those having one AT and are the most abundant and highly polymorphic in the plant genome, but hinder the amplification of specific bands. This suggests that it is due to the semi-complementarity of primers in the PCR alignment stage (Fang and Roose, 1997).

The anchor sequence consists of one, two or three nucleotides, which are anchored at the 3' or 5' end of a microsatellite (SSR), ensuring recognition of the primer with genomic DNA, in order to increase the detection of polymorphic fragments (Yamagishi

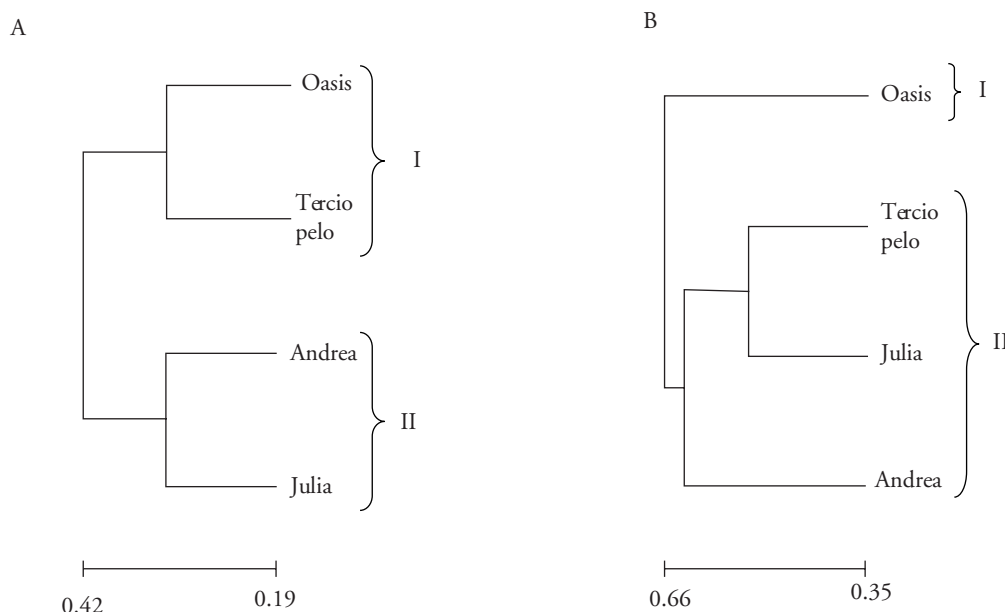


Figura 1. Dendrogramas generados con datos morfológicos (A) y datos moleculares (B), basados en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA.

Figure 1. Dendrograms generated with morphological data (A) and molecular data (B), based on the genetic distance of Nei (1972), using the UPGMA method.

variedades, las cuales permitieron describir un perfil molecular; así se logró una identificación clara de las cuatro variedades evaluadas. Todas las variedades presentaron diferentes bandas específicas: Oasis con 5, Terciopelo con 3, Julia con 2 y Andrea con 1 (Cuadro 3). Los iniciadores ASSR son efectivos para generar información segura y distinguir individuos genéticamente relacionados, en especies domesticadas y ornamentales. Por ejemplo, en *Solanum tuberosum* (Prevost y Wilkinson, 1999), en *Nierembergia lanariaefolia* (Escandón *et al.*, 2005), en *Lilium spp.* (Yamagishi *et al.*, 2002; Arzate-Fernández *et al.*, 2005), y en *Ananas spp.* (Tapia *et al.*, 2005a).

Pradeep *et al.* (2002) y Hu *et al.* (2003) señalan que la efectividad de los iniciadores ASSR es posiblemente la secuencia motivo y la de su ancla, donde una secuencia CT presenta un mayor polimorfismo con respecto a los que tienen una AT y son los más abundantes y altamente polimórficos en el genoma de las plantas, pero dificultan la amplificación de bandas específicas. Ello sugiere que se debe a la semi-complementariedad del iniciador en la etapa de alineación de la PCR (Fang y Roose, 1997).

La secuencia del ancla consiste de uno, dos o tres nucleótidos, los cuales se anclan al final del extremo 3' o 5' de un microsatélite (SSR), asegurando el reconocimiento del iniciador con el ADN genómico, con la finalidad de incrementar la distinción de fragmentos polimórficos (Yamagishi *et al.*, 2002; Pradeep *et al.*, 2002). En el presente estudio, el nivel de distinción entre las cuatro variedades pudo haber dependido de la secuencia del ancla del iniciador. Así, con el iniciador 3'-ASSR15, cuya secuencia es ATG, fue posible obtener 100 % de polimorfismo (Cuadro 2). Esto sugiere que la técnica ISSR puede ser un sistema altamente informativo, rápido y confiable para la identificación de cultivares, como lo señalan Tapia *et al.* (2005a).

Eficiencia entre los marcadores ISSR y los morfológicos

Con los marcadores ISSR se obtuvo una $D_G=0.5$ en promedio, superior a la de los morfológicos ($D_G=0.3$), lo cual sugiere que fueron más eficientes para detectar mayor variabilidad genética entre las cuatro variedades y permite observar mejor las diferencias. Tapia *et al.* (2005a) y Vidal-Barahona *et al.* (2006) reportan también mayor eficiencia de los

Cuadro 3. Matriz de datos de *S. formosissima*, con los cinco iniciadores anclados (ASSR).

Table 3. Data matrix of *S. formosissima*, with the five anchored primers (ASSR).

Longitud de las bandas amplificadas en pb	Variedad			
	Oasis	Tercio pelo	Andrea	Julia
3'-ASSR02				
1500				+
1100				+
950	+++	+++	+++	+++
800	++			++
700	+++	+++	+++	+++
3'-ASSR015				
1350	+			
1100	++		++	
900	++	++	++	
800	++	++		
700		++		++
600	++		++	
500		++	++	
400		+		
300		++	++	
3'-ASSR20				
1300	++	++		++
1100		++		++
1050	+			
900	++	++		++
800	++	++		++
700	+++	+++	+++	+++
600	+++	+++	+++	+++
450		+		
3'-ASSR29				
1350	+			
1200	+++	+++	+++	+++
1000	+			
900	+++	+++	+++	+++
700	+++	+++	+++	+++
600				+
500	++	++		++
3'-ASSR35				
1350	+++	+++	+++	+++
1200	+++	+++	+++	+++
1000	+			
950	+			
850	++		++	++
700	++	++		++
600		++	++	++
450		++	++	++

+ Banda polimórfica específica; ++ banda polimórfica no específica; +++ banda común ♦ + Specific polymorphic band; ++ nonspecific polymorphic band; +++ common band.

marcadores ISSR, respecto a los morfológicos, para discriminar genotipos de piña (*Ananas* spp.) y frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Relación entre la variabilidad genética y la altitud de recolecta

Tanto en el dendrograma morfológico como en el molecular (Figura 1A y 1B), las variedades se agruparon de acuerdo con su D_G . Las cuatro variedades comprendieron una altitud de recolección entre 1950 y 2600 m, pero en los dendrogramas no se observó una tendencia a agruparlas en relación con la altitud. No obstante, en el análisis morfológico se encontró que entre las variedades Julia (2160 m) y Andrea (2238 m) hay una separación de 78 m; y fueron las más emparentadas ($D_G=0.19$). Del mismo modo, entre Oasis (1950 m) y Julia (2160 m) hay una diferencia altitudinal de 210 m y estas variedades fueron las menos emparentadas ($D_G=0.42$). En contraste, para el análisis molecular, las variedades Oasis (1950 m) y Terciopelo (2600 m) con diferencia de altitud de 650 m fueron las más distantes genéticamente ($D_G=0.66$), y ambas presentaron el mayor número de bandas específicas 5 y 3; además, en el análisis morfológico estas mismas variedades comparten menos rasgos morfológicos 8/29, por lo que aparecen más distantes en el dendrograma. Julia (2160 m) y Terciopelo (2600 m) tienen una diferencia de altitud de 440 m y fueron las menos emparentadas genéticamente ($D_G=0.35$).

Sin embargo, Andrea (2238 m) y Oasis (1950 m) muestran una $D_G=0.61$ y una diferencia de altitud de 288 m. No obstante, Andrea se ubicó en el mismo grupo con Julia y Terciopelo probablemente debido al número bajo de bandas específicas que muestra cada una de las variedades en comparación con Oasis (Cuadro 3), por lo que este pudiera ser un factor por el cual está más relacionada con Julia y Terciopelo. Del mismo modo, estas tres variedades en el análisis morfológico presentan en común 15 rasgos morfológicos, lo cual probablemente haya contribuido a que estuvieran estrechamente relacionadas. Así, es posible que la diferencia de altitud entre los lugares de recolección sea un factor que determina la separación genética entre variedades.

De acuerdo con Wen y Hsiao (2001), la diferenciación genética está correlacionada con la altitud; es decir, en una altitud menor hay un promedio

et al., 2002, Pradeep *et al.*, 2002). In this study, the level of distinction among the four varieties may have depended on the primer anchor sequence. Thus, with the primer 3'-ASSR15, whose sequence is ATG, it was possible to obtain 100 % polymorphism (Table 2). This suggests that the ISSR markers can be a highly informative, fast and reliable system for the identification of cultivars, as reported by Tapia *et al.* (2005a).

Efficiency between ISSR and morphological markers

With ISSR markers we obtained a $D_G=0.5$ on average, higher than that of the morphological markers ($D_G=0.3$), which suggests they were more efficient to detect greater genetic variability among the four varieties and differences could be better detected. Tapia *et al.* (2005a) and Vidal-Barahona *et al.* (2006) also reported higher efficiency of ISSR markers in relation to the morphological to discriminate pineapple (*Ananas* spp.) and bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes.

Relationship between genetic variability and collection altitude

Both in the morphological and molecular dendrogram (Figure 1A and 1B), the varieties were grouped according to their D_G . The four varieties included an altitude of collection between 1950 and 2600 m, but no trend to group them in relation to altitude was observed in the dendrograms. However, the morphological analysis showed that between the varieties Julia (2160 m) and Andrea (2238 m) there is a separation of 78 m, and were the most closely related ($D_G=0.19$). Similarly, between Oasis (1950 m) and Julia (2160 m) there is a 210 m difference in altitude, and these varieties were the least related ($D_G=0.42$). In contrast, in the molecular analysis, the varieties Oasis (1950 m) and Terciopelo (2600 m), with an altitude difference of 650 m, were genetically the most distant ($D_G=0.66$), and both recorded the highest number of specific bands, 5 and 3; also in the morphological analysis, these same varieties shared less morphological features 8/29, so they appeared to be more distant in the dendrogram. Julia (2160 m) and Terciopelo (2600 m) have a height difference of 440 m and were genetically the least related ($D_G=0.35$).

significativamente más alto de similaridad genética entre poblaciones de *Lilium*, mientras que en una altitud mayor hay una variación más alta dentro de las poblaciones, ya que experimentan una variación diurna anual mayor. Esto coincide con lo reportado por Arzate-Fernández *et al.* (2005), quienes indican que plantas de *Lilium* recolectadas a 1000 m estuvieron sujetas a un estrés ambiental mayor (cambios de temperatura, vientos fuertes y la cobertura de nieve y hielo), reflejando así una mayor variación genética que aquellas recolectadas a 650 m.

No hubo una correlación significativa entre la distancia genética y la altitud de recolecta, para el análisis morfológico ($R=-0.126$; $p>0.10$). También para el análisis molecular hubo correlación baja y no significativa ($R=0.111$; $p>0.10$), entre la distancia genética y la altitud. Tapia *et al.* (2005b) reportan resultados similares de correlación baja entre marcadores AFLP's y marcadores morfológicos ($R=0.30$; $p=1.0$) en *Citrus* spp. Así mismo, Roldán-Ruiz *et al.* (2001, citados por Martínez *et al.*, 2003) señalan correlación baja entre AFLP y morfología ($r=-0.06$) de *Lolium Perenne* L.

CONCLUSIONES

Los marcadores morfológicos y moleculares (ISSR), permitieron diferenciar las cuatro variedades de *S. formosissima*, pero los ISSR fueron más eficientes que los morfológicos al detectar la mayor variabilidad genética. Se describe un perfil molecular para una clara identificación de cada variedad. No hubo correlación significativa entre la distancia genética y la altitud de recolecta, para el análisis morfológico y para el análisis molecular.

LITERATURA CITADA

- Arzate-Fernández, A. M., M. Miwa, T. Shimada, T. Tonekura, and K. Ogawa. 2005. Genetic diversity of miyamasukashiyuri (*Lilium maculatum* Thumb. Var. Bukosanense), an endemic endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biol.* 20: 57-65.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de los marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoamericana* 17: 221-242.
- Borys, M. W., H. Leszczynska-Borys, and J. L. Galván. 2005. Variants in *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. *Proc. Inter. Soc.* 48: 31-37.
- Escandón, A., M. Pérez De La Torre, M. S. Soto, y N. Zelener, N. 2005. Identificación de clones selectos de *Nierembergia*

However, Andrea (2238 m) and Oasis (1950 m) showed a $D_G=0.61$ and an altitude difference of 288 m. Nevertheless Andrea was placed in the same group with Julia and Terciopelo, probably due to the low number of specific bands showing each one of the varieties compared to Oasis (Table 3); so this could be a reason of being more related to Julia and Terciopelo. Similarly, in the morphological analysis, these three varieties showed to have in common 15 morphological traits, which probably contributed to being closely related. Then, it is possible that the difference in altitude between the collection sites is a factor that determines the genetic separation between varieties.

According to Wen and Hsiao (2001), genetic differentiation is correlated with altitude; that is, at a lower altitude there is a significantly higher average of genetic similarity between populations of *Lilium*, while at a higher altitude there is a greater variation within populations, as they experiment a greater annual diurnal variation. This matches with reports by Arzate-Fernández *et al.* (2005), who indicate that plants of *Lilium* collected at 1000 m were subject to increased environmental stress (temperature changes, strong winds and snow and ice cover), thus reflecting a greater genetic variation than those collected at 650 m.

There was no significant correlation between genetic distance and collection altitude for morphological analysis ($R=-0.126$, $p>0.10$). Also, for molecular analysis the correlation was low and not significant ($R=0.111$; $p>0.10$) between genetic distance and altitude. Tapia *et al.* (2005b) report similar results of low correlation between AFLP's markers and morphological markers ($R=0.30$; $p=1.0$) in *Citrus* spp. Also, Roldán-Ruiz *et al.* (2001, cited by Martínez *et al.*, 2003) indicate low correlation between AFLP and *Lolium perenne* L. ($r=-0.06$) morphology.

CONCLUSIONS

Morphological and molecular markers (ISSR) enabled to differentiate the four varieties of *S. formosissima*, but the ISSR were more efficient than the morphological to detect the highest genetic variability. We described a molecular profile for a clear identification of each variety. There was no significant correlation between genetic distance

- linariaefolia* mediante microsatélites anclados. Rev. Invest. Agropec. 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.
- Hu, J., M. Natakani, L. A. García, T. Kuranouchi, and T. Fujimora. 2003. Genetic analysis in sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSR). Breeding Sci. 53: 297-304.
- Leszczyńska-Borys, H., W. L. Borys, y J. L. Galván. 1995. Relaciones raíz/bulbo y otras características de la *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. Rev. Chapingo S. Hort. 1: 77-84.
- Leszczyńska-Borys, H., y M. W. Borys. 2001. Plantas Bulbosas para Flor de Corte, Macetas, Jardines y Parques. Ediciones UPAP. Puebla, Pue. 85 p.
- Martínez, L., P. Cavagnaro, R. Masuelli, and J. Rodríguez. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. Electr. J. Biotech. 6: 241-250.
- Nei, M. 1972. Original measures of genetic identity and genetic distance genetic. Am. Naturalist 106: 283-292.
- 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 fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98: 107-112.
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). 2003. Guía Técnica para la Descripción Varietal del Lirio Azteca [*Sprekelia formosissima* (L.) Herbert]. ED. SAGARPA. México. 12 p.
- Tapia, C. E., A. H. Guillén, y 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., M. A. Gutiérrez, M. L. Warburton, A. Santacruz, and A. Villegas. 2005b. Characterization of mandarin and collection altitude for the morphological and molecular analyses.
- End of the English version—
- *—
- (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Inter-ciencia 30 (11): 687-693.
- Valadez-Moctezuma, E., G. Kahl, J. Ramser, B. Huntel, y A. Rubluo-Islas. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. Rev. Fitotec. Mex. 24 (1): 103-120.
- Valdenice, M. N., M. Cristofani, A. A. Souza, and M. A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Genet. Mol. Biol. 29 (1): 90-96.
- Vidal-Barahona, A., E. L. Lagunas, M. E. Valadez, y G. Ortiz. 2006. Variabilidad morfológica y molecular de cultivares criollos y mejorados de frijol común en Tabasco, México. Rev. Fitotec. Mex. 29: 273-281.
- 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. B. J. 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 kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat ISSR. New Phytol. 144: 55-63.