

COMPARATIVE STUDY OF THE DISCRIMINATING CAPACITY OF DNA MARKERS AND THEIR EFFECTIVENESS IN ESTABLISHING GENETIC RELATIONSHIPS IN THE GENUS *Tigridia*

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE DISCRIMINACIÓN DE MARCADORES DE ADN Y SU EFECTIVIDAD EN EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES GENÉTICAS EN EL GÉNERO *Tigridia*

Jesús I. Reyes-Díaz¹, Amaury M. Arzate-Fernández^{1*}, José L. Piña-Escutia¹, Luis M. Vázquez-García²

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca km 11.5, Campus Universitario El Cerrillo. 50200. Toluca, Estado de México, México. (amaury1963@yahoo.com.mx). ²Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km. 1.5, Ex hacienda de Santa Ana. 52400. Tenancingo, Estado de México, México.

ABSTRACT

Tigridia Jussieu is an endemic genus to Mexico and taxonomically difficult with limited information about its genetic variability. A diversity assessment conducted using different DNA markers as an inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers will be helpful in the establishment of a broad-based description for improved germplasm curation and the identification of germplasm for genome mapping and breeding of these species. Thus, the objective of this study was to characterize 15 wild species of *Tigridia* by using RAPD and ISSR molecular markers. This study was carried out in the laboratory of Plant Molecular Biology at the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de México between August and November of 2011. In this assay, 13 RAPD primers of 10, 15 and 20 b, and five ISSR primers of the anchored type (ASSR) of 17 b were used to assess the level of genetic variation among 15 wild species of *Tigridia*. With both markers there were 163 amplified bands of which 150 (92.02 %) were polymorphic. The RAPD primers of 10 b generated 12 specific bands with a polymorphism of 95.12 %, for 15 b primers those values were five and 82.93 %, and for 20 b primers eight and 94.59 %, respectively. The RAPD pooled primers presented a polymorphism of 90.76 %, the genetic distance (G_D) among the species ranged from 0.16 (between *T. illecebrosa* and *T. huajuapensis*) to 0.57 (between *T. multiflora* and *T. augusta*). The ISSR primers showed more polymorphism

RESUMEN

Tigridia Jussieu es un género endémico de México, su taxonomía es difícil, y la información sobre su variabilidad genética es limitada. Una evaluación de la diversidad usando diferentes marcadores de ADN, como marcadores de intersecuencias simples repetidas (ISSR) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), será útil para establecer una descripción de base amplia, para la conservación de germoplasma mejorado y la identificación de germoplasma para el mapeo del genoma y el cultivo de estas especies. Así, el objetivo de este estudio fue caracterizar 15 especies silvestres de *Tigridia* usando marcadores moleculares RAPD e ISSR. Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, entre agosto y noviembre de 2011. En este estudio, 13 iniciadores RAPD de 10, 15 y 20 b y cinco iniciadores ISSR de tipo anclado (ASSR) de 17 b fueron usados para evaluar el nivel de variación genética entre las 15 especies silvestres de *Tigridia*. Con ambos marcadores se tuvieron 163 bandas amplificadas, de las cuales 150 (92.02%) eran polimórficas. Los iniciadores RAPD de 10 b generaron 12 bandas específicas con un polimorfismo de 95.12 %, para los iniciadores de 15 b esos valores fueron cinco y 82.93 % y ocho y 94.59 % para los de 20 b, respectivamente. Los iniciadores RAPD agrupados presentaron un polimorfismo de 90.76 %, la distancia genética (G_D) entre las especies varió de 0.16 (entre *T. illecebrosa* y *T. huajuapensis*) a 0.57 (entre *T. multiflora* y *T. augusta*). Los iniciadores ISSR mostraron más polimorfismo (95.45 %) que los iniciadores RAPD. Con los iniciadores ASSR la asociación genética mayor ($G_D=0.89$) se observó entre *T. mexicana* ssp. *mexicana* y *T. durangense*, mientras que los menos relacionados fueron *T. vanhouttei*

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: November, 2014. Approved: April, 2015.

Published as ARTICLE in Agrociencia 49: 361-372. 2015.

(95.45 %) than RAPD primers. With ASSR primers the highest genetic association ($G_D=0.89$) was observed between *T. mexicana* ssp. *mexicana* and *T. durangense*, whereas the least related were *T. vanhouttei* spp. *vanhouttei* and *T. multiflora* ($G_D=0.14$). This study shows that 10 base random primers and 17 base anchored primers were more efficient to detect polymorphism and genetic differentiation among *Tigridia* species.

Key words: Iridaceae, RAPD, ASSR, molecular characterization.

INTRODUCTION

In Mexico there is a large biodiversity of species; among those, *Tigridia* species are culturally significant (medicinal, ornamental, ceremonial and food purposes) and they represent one of the most important biotic resources for the Mexican people (Vázquez *et al.*, 2001). The genus *Tigridia* Jussieu (Tigridieae: Iridaceae) is distributed around the world and Mexico is the focal point for its diversity. The irregular topography and climatic diversity have generated a high number of endemics in this group of plants (Rodríguez and Ortiz-Catedral, 2003b). The *Tigridia* genus group comprises about 45 species and in Mexico there are about 36 species and six subspecies, of which 29 species and six subspecies are endemic. These plants have colourful flowers that exhibit great morphological variation, making many species potentially valuable as cultivated plants. Also, *Tigridia* is considered a taxonomically difficult genus since its useful floral characteristics, which defines the boundaries among species, cause difficulties for the specimen analysis (Rodríguez and Ortiz-Catedral, 2003a). Furthermore, the morphological analysis can contain inaccurate information because it is based on characteristics highly influenced by the environment (Vidal-Barahona *et al.*, 2006).

Thus, the characterization and conservation of wild plant genetic resources should be essential practices that allow the protection and conservation of a plant genetic heritage, especially those of endemic species. Likewise, this allows to evaluating the adaptation of these species to climatic or anthropogenic changes and contribute to the knowledge of the genetic variability of each species and genus, facilitating the selection of genotypes for the development of protection programs or genetic

spp. *vanhouttei* y *T. multiflora* ($G_D=0.14$). Este estudio mostró que los iniciadores aleatorios de 10 bases y los iniciadores anclados de 17 bases fueron más eficientes para detectar el polimorfismo y diferenciación genética entre la especies de *Tigridia*.

Palabras clave: Iridaceae, RAPD, ASSR, caracterización molecular.

INTRODUCCIÓN

En México existe una gran biodiversidad de especies; entre ellas, las especies *Tigridia* son culturalmente significantes (con propósitos medicinales, ornamentales, ceremoniales y alimenticios) y representan uno de los recursos bióticos más importantes para los mexicanos (Vázquez *et al.*, 2001). El género *Tigridia* Jussieu (Tigridieae: Iridaceae) se distribuye por todo el mundo y México es el punto focal de su diversidad. La topografía irregular y diversidad climática han generado un número elevado de endemismos en este grupo de plantas (Rodríguez y Ortiz-Catedral, 2003b). El género *Tigridia* comprende cerca de 45 especies y en México hay alrededor de 36 especies y seis subspecies, de las cuales 29 especies y seis subspecies son endémicas. Estas plantas tienen flores coloridas con gran variación morfológica, por lo cual muchas especies son potencialmente valiosas como plantas cultivadas. Además, *Tigridia* es considerado un género con dificultades en su taxonomía ya que sus características florales útiles, que definen los límites entre las especies, causan dificultades para el análisis de los especímenes (Rodríguez y Ortiz-Catedral, 2003a). Además, el análisis morfológico puede contener información inexacta porque se basa en las características muy influenciadas por el ambiente (Vidal-Barahona *et al.*, 2006).

Así, la caracterización y conservación de recursos fitogenéticos silvestres deben ser prácticas esenciales que permitan la protección y conservación de un patrimonio genético de la planta, especialmente las de especies endémicas. Además, esto permite evaluar la adaptación de estas especies a los cambios climáticos o antropogénicos y contribuye al conocimiento de la variabilidad genética de cada especie y género, facilitando la selección de genotipos para el desarrollo de programas de protección o mejoramiento genético (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009; Valdés *et al.*, 2010).

breeding (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009; Valdés *et al.*, 2010).

Traditionally, the study of genetic variation and identification of plant species consisted of the morphological description of germplasm. Now, biochemical and molecular markers techniques offer new tools to study the genetic variability of plant populations at DNA levels, making their characterization more specific. Though there is a great number of DNA markers due to low technical input and low cost, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), or Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), and Anchored Simple Sequence Repeat (ASSR) primers (Debenner and Mattiesch, 1998; Rentarí, 2011), are applicable to any type of plant material without the need to evaluate many characters and, besides, free from epistatic effects (Azofeifa-Delgado, 2006). The success of RAPD is highly dependent on these small arbitrary oligonucleotides that hybridize onto the complementary DNA fragments. Its performance is convenient and does not require any information about the DNA sequence to be amplified (Weder, 2002). The ISSR technique amplifies genomic regions between two microsatellites with ASSR type primers (Yamagishi *et al.*, 2002) and it is fast because of its high rate of reproducibility and efficiency while detecting polymorphisms (Pradeep *et al.*, 2002). Both techniques are successfully utilized to calculate the intra or inter-specific genetic diversity in different domesticated and wild species, like *Lilium maculatum* (Arzate-Fernández *et al.*, 2005), nine varieties of *Tigridia pavonia* (Piña-Escutia *et al.*, 2010a, 2010b) and *Sprekelia formosissima* (Bautista-Puga *et al.*, 2011).

Thus, the objective of this study was to characterize 15 wild species of *Tigridia* using RAPD and ISSR molecular markers.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Fifteen wild species of *Tigridia Jussieu* were used in the present analyses: *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta*, *T. bicolor*, *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii*, *T. flammea*, *T. graciellae*, *T. hallbergii* ssp. *lloydi*, *T. huajuapense*, *T. illecebrosa*, *T. meleagris*, *T. mexicana* ssp. *mexicana*, *T. mertonii*, *T. multiflora* and *T. vanhouttei* ssp. *vanhouttei*. The plant material is part of the

Tradicionalmente, el estudio de la variación genética e identificación de especies de plantas consiste en la descripción morfológica de germoplasma. Ahora, las técnicas de marcadores moleculares ofrecen herramientas nuevas para estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de plantas en los niveles de ADN, lo que permite su caracterización más específica. Hay un gran número de marcadores de ADN; que a pesar de su poco requerimiento técnico y costo bajo; la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), o el de marcadores moleculares de intersecuencias simples repetidas (ISSR) e iniciadores de secuencias simples repetidas de tipo anclado (ASSR) (Debenner y Mattiesch, 1998; Rentarí, 2011) son aplicables a cualquier tipo de material vegetal sin la necesidad de evaluar muchos caracteres y, además, están libre de efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado, 2006). El éxito de RAPD es altamente dependiente de estos oligonucleótidos pequeños arbitrarios que hibridan sobre los fragmentos complementarios de ADN. Su rendimiento es bueno y no requiere ninguna información sobre la secuencia del ADN amplificado (Weder, 2002). La técnica ISSR amplifica regiones genómicas entre dos microsatélites con los iniciadores tipo ASSR (Yamagishi *et al.*, 2002) y es rápida debido a su tasa alta de reproducibilidad y eficiencia al detectar polimorfismos (Pradeep *et al.*, 2002). Ambas técnicas se usan con éxito para calcular la diversidad genética intra o inter específicas en diferentes especies domesticadas y silvestres, como *Lilium maculatum* (Arzate-Fernández *et al.*, 2005), nueve variedades de *Tigridia pavonia* (Piña-Escutia *et al.*, 2010a, 2010b) y *Sprekelia formosissima* (Bautista-Puga *et al.*, 2011).

Así, el objetivo de este estudio fue caracterizar 15 especies silvestres de *Tigridia* usando marcadores moleculares RAPD e ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Quince especies silvestres de *Tigridia Jussieu* se usaron en el presente estudio: *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta*, *T. bicolor*, *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii*, *T. flammea*, *T. graciellae*, *T. hallbergii* ssp. *lloydi*, *T. huajuapense*, *T. illecebrosa*, *T. meleagris*, *T. mexicana* ssp. *mexicana*, *T. mertonii*, *T. multiflora* y *T. vanhouttei* ssp. *vanhouttei*. El material vegetal es parte de la colección de germoplasma del Centro de Conservación de

germplasm collection of the Centre for Wildlife Conservation in Tenancingo, Estado de México. Fresh leaf sections were taken from each individual. All of the samples were processed in the Plant Molecular Biology Laboratory, Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de México.

RAPD and ASSR analyses

DNA extraction

The genomic DNA was isolated from 100 mg of frozen leaves of each species, following a protocol with Plant DNAzol® Reagent (Invitrogen™). The DNA was resuspended in 50 µL of TE buffer (Tris-HCl EDTA) and was stored at -20 °C until ready for use.

Amplification by PCR and electrophoresis of the DNA

Thirteen RAPD primers and five ISSR primers of type anchored were used for the PCR (Table 1).

PCR mix was performed in 10 µL containing 2 µL of 5X My Taq Reaction buffer (15 mM MgCl₂ and 15 mM dNTPs) (Bioline™), 0.1 µL My Taq Polymerase (Bioline™), 0.2 µL of the primer (20 µM) (Invitrogen™) and 1 µL of DNA (10 ng).

The amplification cycles for the primers Y24, Y37, Y38 and Y41 were: an initial cycle of 5 min at 94 °C, 1 min at 54 °C and 2 min at 72 °C; 41 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 54 °C and 2 min at 72 °C followed by one final extension cycle of 1 min at 94 °C, 1 min at 54 °C and 5 min at 72 °C. For the primers P619 and P635 the cycles were: one cycle of 4 min at 94 °C; 40 cycles of 1 min at 94 °C, 3 min at 44 °C and 2 min at 72 °C followed by one cycle of 5 min at 72 °C. The cycles for the primers P628 and P647 were: one cycle of 4 min at 94 °C; 40 cycles of 1 min at 94 °C, 3 min at 50 °C and 2 min at 72 °C followed by one cycle of 5 min at 72 °C. The cycles for the primers P473 and P475 were: one cycle of 2 min at 92 °C; 40 cycles of 1 min at 91 °C, 80 sec at 50 °C and 2 min at 72 °C followed by one cycle of 10 min at 72 °C. The cycles for the primers P495, P496 and P497 were: one cycle of 2 min at 92 °C; 39 cycles of 1 min at 91 °C, 80 sec at 52 °C and 2 min at 72 °C followed by one cycle of 10 min at 72 °C.

Finally, for the primers 3'-ASSR02, 3'-ASSR15, 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 and 3'-ASSR35 the cycles were performed according to Yamagishi *et al.* (2002).

The DNA fragments amplification was performed in a thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf®) model Hamburg 22331-246227. The separation of the fragments was realized in horizontal electrophoresis chambers (Easycast™), with type II agarose gels (Sigma®) at 1 %, to which 3 µL of

Especies Silvestre en Tenancingo, Estado de México. Las secciones de hojas frescas se tomaron de cada individuo. Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Análisis RAPD y ASSR

Extracción de DNA

El ADN genómico fue aislado de 100 mg de hojas congeladas de cada especie, siguiendo un protocolo con Planta ADNzol® Reagent (Invitrogen™). El ADN se resuspendió en 50 µL de amortiguador TE (Tris-HCl EDTA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación por PCR y electroforesis de ADN

Trece iniciadores RAPD y cinco iniciadores ISSR de tipo anclado fueron utilizados para la PCR (Cuadro 1).

La mezcla PCR se preparó en 10 µL que contenían 2 µL de amortiguador de reacción My Taq 5X (MgCl₂ 15 mM y dNTPs 15 mM) (Bioline™), 0.2 µL iniciador (20 µM) (Invitrogen™) y 1 µL de ADN (10 ng).

Los ciclos de amplificación de los iniciadores Y24, Y37, Y38 y Y41 fueron: un ciclo inicial de 5 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 2 min a 72 °C; 41 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 2 min a 72 °C seguido de un ciclo de extensión final de 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C y 5 min a 72 °C. Para los iniciadores P619 y P635 los ciclos fueron: uno de 4 min a 94 °C; 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 3 min a 44 °C y 2 min a 72 °C seguido de un ciclo de 5 min a 72 °C. Los ciclos para los iniciadores P628 y P647 fueron: un ciclo de 4 min a 94 °C; 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 3 min a 50 °C y 2 min a 72 °C seguido de un ciclo de 5 min a 72 °C. Los ciclos de los iniciadores P473 y P475 fueron: un ciclo de 2 min a 92 °C; 40 ciclos de 1 min a 91 °C, 80 seg a 50 °C y 2 min a 72 °C seguido de un ciclo de 10 min a 72 °C. Los ciclos de los iniciadores P495, P496 y P497 fueron: un ciclo de 2 min a 92 °C; 39 ciclos de 1 min a 91 °C, 80 seg a 52 °C y 2 min a 72 °C seguido de un ciclo de 10 min a 72 °C.

Finalmente, para los iniciadores 3'-ASSR02, 3'-ASSR15, 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 and 3'-ASSR35 los ciclos se realizaron de acuerdo con Yamagishi *et al.* (2002).

La amplificación de fragmentos de ADN fue realizada en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®) modelo Hamburg 22331-246227. La separación de los fragmentos se realizó en cámaras de electroforesis horizontal (Easycast™), con geles de agarosa tipo II (Sigma®) al 1 %, a los cuales se agregaron 3 µL de bromuro de etidio (Sigma®). Las condiciones de

ethidium bromide (Sigma®) were added. The running conditions for each sample were 80 V and 120 mA for 80 min. The DNA bands were photographed under ultraviolet light using a UV Transilluminator BioDoc-It Imaging System (UVP™). The sizes of the amplification products were estimated with a DNA ladder (100 bp to 3000 bp) (Fermentas™).

Statistical analysis

Banding patterns were constructed considering each band as absent, (0), or present, (1). To determine genetic relationships, a dendrogram was constructed for each primer group with the data using the POPGENE program (Yeh and Boyle, 1999) with the UPGMA method based on the Nei (1972) matrix genetic distances. The total number of bands (TB), polymorphic bands (PB) and percentage of polymorphic bands (%P) were calculated using the same program.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, PCR amplification with 10, 15 and 20 length base RAPD primers, and 17 length base ASSR led to reproducible fragment patterns for all species of *Tigridia* evaluated. In total, with both markers 163 bands were detected, in which 150 (92.02 %) were polymorphic. It should be noted that the 18 primers generated 27 specific bands (Table 1). Among the 15 *Tigridia* species evaluated, *T. alpestris* ssp. *obtusa* showed the major number of specific bands (5), whereas *T. bicolor*, *T. illecebrosa* and *T. mertonii* did not show any.

RAPD analysis

The RAPD primers of 10 b showed 41 total bands, in which 12 bands were specific; the average of total fragments generated per primer were 10.25 with a polymorphism of 95.12 %. For the 15 b primers, those values were 41, 5, 6.83 and 82.93 %, respectively, and for the 20 b primers, 37, 8, 12.33 and 94.59 %, respectively. In total, RAPD primers pooled (10, 15 and 20 b) showed 119 bands in which 25 were specific, and the average of total fragments generated per primer were 9.15 with a polymorphism of 90.76 % (Table 1).

Debener *et al.* (1996) reported the use of RAPD primers to analyze the genetic variation among wild species and cultivars of *Rosa* spp. and they proved their effectiveness to show a high polymorphism to

funcionamiento para cada muestra fueron 80 V y 120 mA durante 80 min. Las bandas de ADN fueron fotografiadas bajo luz ultravioleta usando un transiluminador UV BioDoc-It System Imaging (UVP™). Los tamaños de los productos de amplificación se calcularon con un marcador estándar de ADN (100 bp a 3000 bp) (Fermentas™).

Análisis estadístico

Los patrones de bandas fueron contruidos tomando cada banda como ausente, (0), o presente, (1). Para determinar las relaciones genéticas, un dendrograma se construyó para cada grupo de iniciadores con los datos usando el programa POPGENE (Yeh y Boyle, 1999), con el método UPGMA, basado en la matriz Nei (1972) de distancias genéticas. El número total de bandas (TB), bandas polimórficas (PB) y porcentaje de bandas polimórficas (%P) se calcularon usando el mismo programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio, la amplificación por PCR con iniciadores RAPD con longitud de 10, 15 y 20 bases y ASSR con longitud de 17 bases llevó a patrones reproducibles de fragmentos para todas las especies de *Tigridia* evaluadas. En total, con ambos marcadores se detectaron 163 bandas, en la que 150 (92.02 %) fueron polimórficas. Cabe señalar que los 18 iniciadores generaron 27 bandas específicas (Cuadro 1). Entre las 15 especies de *Tigridia* evaluadas, *T. alpestris* ssp. *obtusa* mostró el número mayor de bandas específicas (5), mientras que *T. bicolor*, *T. illecebrosa* y *T. mertonii* no mostraron alguna.

Analysis RAPD

Los iniciadores RAPD de 10 b mostraron 41 bandas en total, en las que 12 bandas fueron específicas; el promedio de fragmentos totales generados por iniciador fueron 10.25 con un polimorfismo de 95.12 %. Para los iniciadores 15 b, esos valores fueron 41, 5, 6.83 y 82.93 %, respectivamente, y para los iniciadores 20 b, fueron 37, 8, 12.33 y 94.59 %, respectivamente. En total, los iniciadores RAPD agrupados (10, 15 y 20 b) mostraron 119 bandas, de las que 25 fueron específicas, y el promedio de fragmentos totales generados por iniciador fueron 9.15, con un polimorfismo de 90.76 % (Cuadro 1).

Table 1. Primers description: Type, base (b), number of patterns (NP), total bands (TB), common bands (CB), specific bands (SB), polymorphic bands (PB), percentage of polymorphism (P) and size of the amplified fragments (SF) for each RAPD and ASSR primer used.**Cuadro 1. Descripción de los iniciadores: Tipo, base (b), patrones numéricos (NP), bandas totales (TB), bandas comunes (CB), bandas específicas (SB), bandas polimórficas (PB), porcentaje de polimorfismo (P) y tamaño de los fragmentos amplificados (SF) por cada iniciador RAPD y ASSR usado.**

Type	b	Primer	NP	TB	CB	SB	PB	%P	SF
RAPD	10	Y24 [†]	11	10	1	4	9	90	200-2000
		Y37 [†]	12	11	0	1	11	100	200-1500
		Y38 [†]	7	8	1	3	7	87.5	500-2500
		Y41 [†]	12	12	0	4	12	100	200-3000
	15	P619 [§]	4	6	3	0	3	50	900-3000
		P628 [§]	11	10	0	3	10	100	400-2000
		P635 [§]	6	5	2	0	3	60	1200-2300
		P647 [§]	13	10	0	0	10	100	850-2500
		P473 [§]	7	7	1	2	6	85.7	500-1200
		P475 [§]	4	3	1	0	2	66.7	400-600
	20	P495 [§]	4	6	1	1	5	83.3	400-1500
		P496 [§]	14	20	0	4	20	100	250-3100
		P497 [§]	11	11	1	3	10	90.1	250-1100
ASSR	17	3'ASSR02 [‡]	15	13	0	1	13	100	300-1500
		3'ASSR15 [‡]	6	7	2	0	5	71.4	400-900
		3'ASSR20 [‡]	8	8	0	0	8	100	600-2000
		3'ASSR29 [‡]	12	8	0	1	8	100	550-1200
		3'ASSR35 [‡]	13	8	0	0	8	100	550-1200
Total			170	163	13	27	150	92.02	

[†]Yamagishi (1995) ; [‡]Yamagishi *et al.* (2002); [§]Debener and Mattiesch (1998).

differentiate the used genotypes. Likewise, Kasaian *et al.* (2011) used RAPD markers of 10 b for molecular characterization of five species of *Juniperus* L. endemic to Iran, allowing a clear distinction of each. Our results also showed that, with shorter length of the primer, the percentage of polymorphism was higher. The reason why RAPD primers of 10 b were more efficient, as compared with those of 15 or 20 b, could be due to the temperature used during the stage of alignment (54 °C for primers of 10 b, 44 °C-50 °C for the primers of 15 b, and 52 °C for primers of 20 b), because the binding of the oligonucleotides with their complementary sites is more stable when using a higher temperature (Espinosa, 2011). In contrast, Debener and Mattiesch (1998), Yamagishi *et al.* (2002) and Piña-Escutia *et al.* (2010a), while characterizing *Rosa multiflora*, *Lilium* and *T. pavonia*, respectively, mentioned that the primers of 20 b were

Debener *et al.* (1996) documentaron el uso de iniciadores RAPD para analizar la variación genética entre especies silvestres y cultivares de *Rosa* spp. y probaron su eficacia para mostrar un polimorfismo alto para diferenciar los genotipos usados. Asimismo, Kasaian *et al.* (2011) usaron los marcadores RAPD de 10 b para la caracterización molecular de cinco especies de *Juniperus* L. endémico de Irán, lo cual permitió una distinción clara de cada una. Nuestros resultados también mostraron que, con una longitud más corta del iniciador, el porcentaje de polimorfismo fue mayor. La razón por la cual los iniciadores RAPD de 10 b fueron más eficiente, comparados con los de 15 o 20 b, podría deberse a la temperatura usada durante la fase de alineación (54 °C para iniciadores de 10 b, 44 °C a 50 °C para iniciadores de 15 b, y 52 °C para iniciadores de 20 b), porque la vinculación de

the most efficient to amplify polymorphic bands, compared to other RAPD primers (10 or 15 b).

The dendrogram based on UPGMA analysis for pooled (10, 15 and 20 b) RAPD data showed the genetic differentiation of 15 wild species of *Tigridia*. The genetic distance (GD) among the species ranged from 0.16 (between *T. illecebrosa* and *T. huajuapensis*) to 0.57 (between *T. multiflora* and *T. augusta*). *Tigridia* species were grouped in four clusters: group I clustered *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta* and *T. bicolor*; group II included *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii*, *T. graciellae*, *T. huajuapensis*, *T. illecebrosa*, *T. mexicana* ssp. *mexicana*, *T. mertonii*, *T. multiflora* and *T. vanhouttei* ssp. *vanhouttei*; group III clustered *T. hallbergii* ssp. *lloydi* and *T. meleagris*; and group IV included only *T. meleagris* (Figure 1a).

In the dendrogram, the species were not grouped according to the classification system of Molseed (1970) and did not show any correlation with phenology (data not shown). However, Wen and Hsiao (2001) suggest that the species collected in different geographical areas can be grouped within the same group, showing a correlation between the genetic diversity and geographic location of a collected species. In some cases, it was possible to establish a correlation with the altitude of geographical area of the species collected. Thus, in the group II, *T. huajuapensis* and *T. illecebrosa* have a growth restricted to desert scrub of the states of Puebla and Oaxaca (Mexico), between 1500 and 1900 m amsl (Cruden, 1968; 1975; Espejo-Serna and López-Ferrari, 1996). Furthermore, in group IV *T. meleagris* was left apart from the rest of the species probably because is the most rampant species of *Tigridia* in Mexico, ranging from 1300 to 2000 m amsl (Espejo-Serna and López-Ferrari, 1996). This was also possible because *T. meleagris* is the only species belonging to the subgenus *Hydrotaenia*: *meleagris* complex (nectarials structures shaped tip) (Molseed, 1970).

ASSR analysis

The total number of reproducible bands with five ISSR primers anchored-type was 44, with an interval of 300 to 2000 bp in the size of the amplified fragments. Of the 44 bands, 42 were polymorphic, with an average of 8.8 bands per primer. Polymorphic

los oligonucleótidos con sus sitios complementarios es más estable cuando se usa una temperatura más alta (Espinosa, 2011). En contraste Debener y Matthesch (1998), Yamagishi *et al.* (2002) y Piña-Escutia *et al.* (2010a), al caracterizar *Rosa multiflora*, *Lilium* y *T. pavonia*, respectivamente, señalaron que los iniciadores de 20 b fueron los más eficientes para amplificar las bandas polimórficas, comparados con otros iniciadores RAPD (10 o 15 b).

El dendrograma basado en el análisis UPGMA por agrupamiento de datos RAPD (10, 15 y 20 b) mostró las diferencias genéticas de las 15 especies silvestres de *Tigridia*. La distancia genética (GD) entre las especies varió de 0.16 (entre *T. illecebrosa* y *T. huajuapensis*) a 0.57 (entre *T. multiflora* y *T. augusta*). Las especies de *Tigridia* fueron agrupadas en cuatro conglomerados: el grupo I incluyó a *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta* y *T. bicolor*; el grupo II incluyó a *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii*, *T. graciellae*, *T. huajuapensis*, *T. illecebrosa*, *T. mexicana* ssp. *mexicana*, *T. mertonii*, *T. multiflora* y *T. vanhouttei* ssp. *vanhouttei*; el grupo III incluyó a *T. hallbergii* ssp. *lloydi* y *T. meleagris*; y el grupo IV incluyó sólo a *T. meleagris* (Figura 1a).

En el dendrograma las especies no se agruparon según el sistema de clasificación de Molseed (1970) y no mostraron correlación con la fenología (datos no mostrados). Sin embargo, Wen y Hsiao (2001) sugieren que las especies recolectadas en diferentes áreas geográficas pueden agruparse dentro del mismo grupo, mostrando una correlación entre la diversidad genética y la ubicación geográfica de las especies recolectadas. En algunos casos, fue posible establecer una correlación con la altitud de la zona geográfica donde se recolectaron las especies. Así, en el grupo II, *T. huajuapensis* y *T. illecebrosa* tienen un crecimiento restringido al matorral del desierto de los estados de Puebla y Oaxaca (México), entre 1500 y 1900 msnm (Cruden, 1968; 1975; Espejo-Serna y López-Ferrari, 1996). Además, *T. meleagris* en el grupo IV quedó apartada del resto de las especies probablemente porque es la más rampante de las especies de *Tigridia* en México, que van de 1300 a 2000 msnm (Espejo-Serna and López-Ferrari, 1996). También fue posible porque el *T. meleagris* es la única especie que pertenece al subgénero *Hydrotaenia*: complejo *meleagris* (estructuras nectariales en forma de punta) (Molseed, 1970).

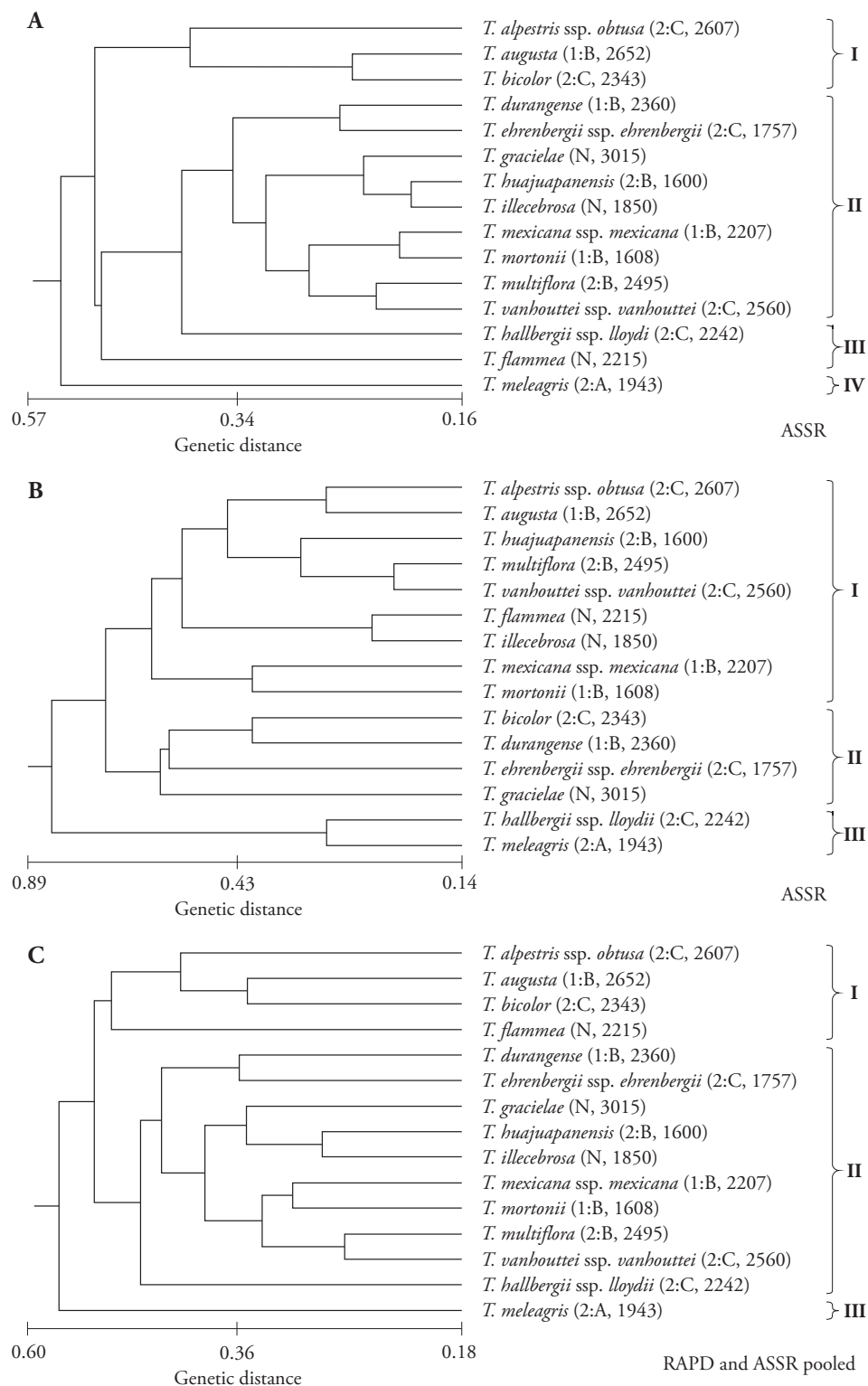


Figure 1. Dendrograms generated using UPGMA analysis, showing relationships among 15 species of *Tigridia*, based on: A) RAPD pooled (10 b, 15 b and 20 b); B) ASSR data; and C) ASSR and RAPD pooled. (Molseed classification, where 1=Subgenus *Tigridia*: B=complex *violaceae*. 2=Subgenus *Hydrotaenia*: A=complex *meleagris*, B=complex *multiflora*, and C=complex *vanhouttei*. N=Not classified; Altitude).

Figura 1. Dendrogramas obtenidos con análisis UPGMA, que muestran las relaciones entre 15 especies de *Tigridia*, están basados en: A) RAPD agrupado (10 b, 15 b y 20 b); B) datos ASSR; y C) ASSR y RAPD agrupados (Clasificación de Molseed, donde 1=Subgénero *Tigridia*: B=complejo *violaceae*. 2=Subgénero *Hydrotaenia*: A=complejo *meleagris*, B=complejo *multiflora*, y C=complejo *vanhouttei*. N=sin clasificar; Altitud).

bands ranged between 71.4 to 100 %, with an average of 95.45 % per primer (Table 1).

These results proved the high efficiency of anchored microsatellite (ASSR) to assess the genetic diversity of 15 species of the genus *Tigridia*, because four of the five primers used showed 100 % of polymorphism. The effectiveness of the ASSR primers as well as the type of the motive replicate is possibly favoured by 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).

With the five primers, two specific bands were generated in two of the 15 species tested, of which the species *T. augusta* and *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii* showed one band each, and these bands were amplified by the 3'ASSR20 and 3'ASSR02 primers. Furthermore, all ASSR primers used showed polymorphic banding patterns, and it was possible that one, the 3'ASSR02, could differentiate the 15 species of *Tigridia* Jussieu (Figure 2 and Table 1). These results are similar to those reported by Piña-Escutia *et al.* (2010b) who found that, with usinly only one ASSR primer, was enough to molecularly characterize nine varieties of *T. pavonia*. Those markers showed genetic diversity among varieties, distinguishing each one of them. In addition, Bautista-Puga *et al.* (2011) evaluated four botanical varieties of *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert using ASSR primers ranging 57 to 100 % polymorphism among those varieties, generating a molecular profile for an unambiguous identification for each of them.

The dendrogram generated from ASSR data (Figure 1b) formed three groups among species of *Tigridia*: group I included *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta*, *T. huajuapensis*, *T. multiflora*, *T. vanhouttei* ssp. *vanhouttei*, *T. flammea*, *T. illecebrosa*, *T. mexicana* ssp. *mexicana* and *T. Mortonii*; group II included *T. bicolor*, *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii* and *T. graciellae*; and group III included *T. hallbergii* ssp. *lloydi* and *T. meleagris*. The dendrogram did not show any correlation between the morphological characteristics and phenology of these species (data not shown), but the same phenomenon occurred

Análisis ASSR

El número total de bandas reproducibles con los cinco iniciadores ISSR tipo anclado fueron 44, con un intervalo de 300 a 2000 bp en el tamaño de los fragmentos amplificados. De las 44 bandas, 42 fueron polimórficas, con un promedio de 8.8 bandas por iniciador. Las bandas polimórficas oscilaron entre 71.4 a 100 %, con un promedio de 95.45% por iniciador (Cuadro 1).

Estos resultados mostraron la eficiencia alta de los microsatélites anclados (ASSR) para evaluar la diversidad genética de las 15 especies del género *Tigridia*, debido a que cuatro de los cinco iniciadores utilizados mostraron 100 % de polimorfismo. La efectividad de los iniciadores ASSR, así como del tipo de motivo de repetición, posiblemente es favorecida por la secuencia de su sistema de anclaje. Las secuencias motivo CT producen un polimorfismo mayor con respecto a las repeticiones AT (Pradeep *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003), que a pesar de ser la más abundante en los genomas de plantas, tienen la desventaja que la amplificación de fragmentos de ADN es baja; esto puede deberse a la semi-complementariedad del iniciador en la etapa de alineamiento de la PCR (Fang y Roose, 1997).

Con los cinco iniciadores, dos bandas específicas se generaron en dos de las 15 especies evaluadas; de ellas *T. augusta* y *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii* mostraron una banda cada una, y estas bandas fueron amplificadas con los iniciadores 3'ASSR20 and 3'ASSR02. Además, todos los iniciadores ASSR utilizados mostraron patrones de bandeo polimórficos, y fue posible que uno, el 3'ASSR02, diferenciara las 15 especies de *Tigridia* Jussieu (Figura 2 y Cuadro 1). Estos resultados son similares a los reportados por Piña-Escutia *et al.* (2010b), quienes encontraron que un sólo iniciador ASSR fue suficiente para caracterizar molecularmente nueve variedades de *T. pavonia*. Esos marcadores mostraron la diversidad genética entre las variedades, distinguiendo cada una de ellas. Además, Bautista-Puga *et al.* (2011) evaluaron cuatro variedades botánicas de *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert usando los iniciadores ASSR, con intervalo de 57 a 100% de polimorfismo entre las variedades, que generan un perfil molecular para una identificación inequívoca de cada una de ellas.

El dendrograma generado a partir de datos ASSR (Figura 1b) formó tres grupos entre las especies

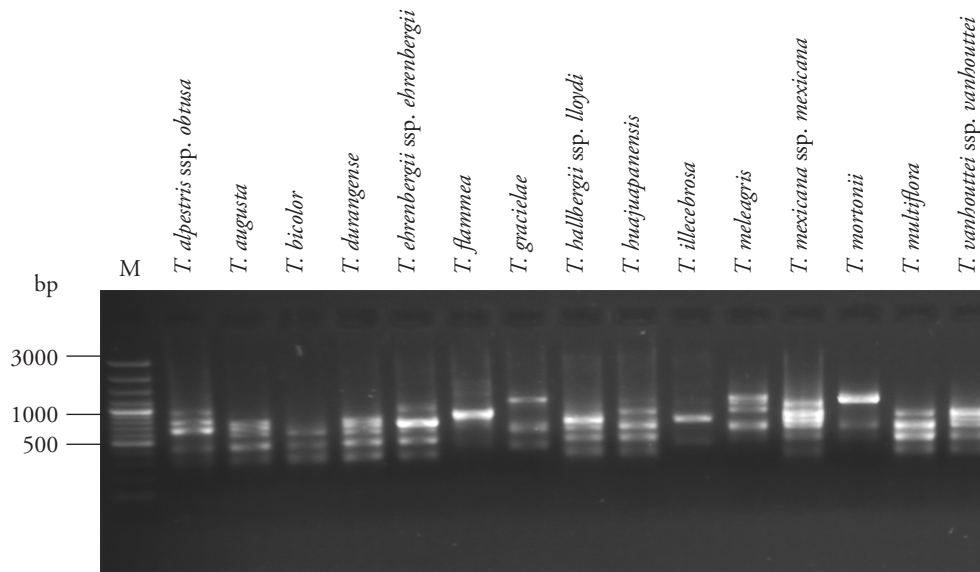


Figure 2. ASSR fragment pattern of 15 wild species of *Tigridia* generated by the primer 3'ASSR02. The amplification products were separated on 1 % agarose gels in 1×TAE buffer stained with ethidium bromide and photographed under UV light. bp: Base pairs. DNA ladder of 100 bp to 3000 bp (M).

Figura 2. Patrón de bandeo ASSR de 15 especies silvestres de *Tigridia* generado por el iniciador 3'ASSR02. Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1 ×, teñidos con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV. bp: Pares de bases. Marcador estándar de ADN de 100 bp a 3000 bp (M).

within the species of restricted distribution as in the dendrogram of RAPD pooled data. The highest genetic association ($G_D=0.89$) was found between *T. mexicana* ssp. *mexicana* and *T. durangense*, whereas the least related were *T. vanhouttei* spp. *vanhouttei* and *T. multiflora* ($G_D=0.14$).

Finally the dendrogram with pooled data (RAPD and ASSR) (Figure 1c) showed a range of G_D of 0.18 (between *T. vanhouteii* spp. *vanhouttei* and *T. multiflora*) to 0.6 (between *T. meleagris* and *T. hallbergii* ssp. *lloydi*). Their topology had the same characteristics of the RAPD pooled dendrogram.

By the use of RAPD and ISSR anchored primers, this research showed a wide genetic diversity among 15 species of *Tigridia*, which might be explained by the fact that Mexico is the center of origin and dispersal of the genus (Rodríguez and Ortiz-Catedral, 2003a, 2003b). Similar results were reported in populations of *Passiflora edulis* Sims using RAPD markers in Brazil, where the studies show high levels of diversity in this species, explained by the fact that this country is center of origin and diversity of the species (Bellon *et al.*, 2007).

de *Tigridia*: el grupo I incluyó a *T. alpestris* ssp. *obtusa*, *T. augusta*, *T. huajuapensis*, *T. multiflora*, *T. vanhouttei* spp. *vanhouttei*, *T. flammea*, *T. illecebrosa*, *T. mexicana* ssp. *mexicana* y *T. mortonii*; el grupo II incluyó a *T. bicolor*, *T. durangense*, *T. ehrenbergii* ssp. *ehrenbergii* y *T. graciela*; y el grupo III incluyó a *T. hallbergii* ssp. *lloydi* y *T. meleagris*. El dendrograma no mostró correlación entre las características morfológicas y la fenología de estas especies (datos no mostrados), pero el mismo fenómeno ocurrió dentro de las especies de distribución restringida, como en el dendrograma de datos RAPD agrupados. La asociación genética más alta ($G_D=0.89$) se encontró entre *T. mexicana* ssp. *mexicana* y *T. durangense*, mientras que las menos relacionadas fueron *T. vanhouttei* spp. *vanhouttei* y *T. multiflora* ($G_D=0.14$).

Finalmente, el dendrograma con datos agrupados (RAPD y ASSR) (Figura 1c) mostraron un intervalo de G_D de 0.18 (entre *T. vanhouteii* spp. *vanhouttei* y *T. multiflora*) a 0.6 (entre *T. meleagris* y *T. hallbergii* ssp. *lloydi*). Su topología tuvo las mismas características del dendrograma RAPD agrupado.

CONCLUSIONS

The analysis showed the effectiveness of 10, 15 or 20 bases Random Amplified Polymorphic DNA primers and 17 bases Inter Simple Sequence Repeat of type Anchored in the detection of polymorphism and genetic differentiation of 15 wild species of *Tigridia*. The study revealed that 10 base random primers and 17 base anchored primers were more efficient to detect polymorphism and genetic differentiation of the 15 *Tigridia* species.

LITERATURE CITED

- 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.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de los marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoam.* 17: 221-242.
- Bautista-Puga, M. D., L. M. Vázquez-García, H. Leszczynska-Borys, M. W. Borys, and A. M. Arzate-Fernández. 2011. Characterization of aztec lily through morphological and molecular markers. *Agrociencia* 45: 413-422.
- Bellon, G., F. G. Faleiro, J. R. Peixoto, K. Pereira, N. L. Vilela, E. Carvalho, G. A. Braga, and C. Teixeira. 2007. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims con base em marcadores RAPD. *Rev. Bras. Frutic.* 29 (1): 124-127.
- Cruden, W. R. 1968. Three new species of *Tigridia* (Iridaceae) from Mexico. *Brittonia* 20: 314-320.
- Cruden, W. R. 1975. New Tigridieae (Iridaceae) from Mexico. *Brittonia* 27: 103-109.
- Debener, T., C. Bartels, and L. Mattiesch. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Mol. Breeding* 2: 321-327.
- Debener, T., and L. Mattiesch. 1998. Effective pairwise combination of long primers for RAPDS analyses in roses. *Plant Breeding* 117: 147-151.
- Gutiérrez-Díez, A., J. Martínez-de la Cerda, E. A. García-Zambrano, L. Iracheta-Donjuan, J. D. Ocampo-Morales, and I. M. Cerda-Hurtado. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (1): 9-18.
- Espejo-Serna, A., and A. R. López-Ferrari. 1996. Comentarios florístico-ecológicos sobre las iridáceas mexicanas. *Acta Bot. Mex.* 34: 25-47.
- Espinosa, A. L. 2011. Capítulo 17: Guía práctica sobre la técnica de PCR. Parte III: Las herramientas moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ed. Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. Argentina. 2010. pp: 517-540.
- Fang, D. Q., and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeats markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.

Mediante iniciadores RAPD e ISSR anclados, esta investigación mostró la diversidad amplia entre 15 especies de *Tigridia*, lo cual se podría explicar porque México es el centro de origen y dispersión del género (Rodríguez y Ortiz-Catedral, 2003a, 2003b). Resultados similares fueron documentados en poblaciones de *Passiflora edulis* Sims en Brasil con marcadores RAPD, los estudios mostraron niveles altos de diversidad en esta especie, explicados porque ese país es centro de origen y diversidad de la especie (Bellon *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

El análisis mostró la efectividad de iniciadores RAPD de 10, 15 o 20 bases y de ISSR anclados de 17 bases para la detección de polimorfismo y diferenciación genética de 15 especies silvestres de *Tigridia*. El estudio reveló que los iniciadores RAPD de 10 bases y los ISSR de 17 fueron los más eficientes para detectar polimorfismos y diferenciación genética de las 15 especies de *Tigridia*.

—Fin de la versión en español—



- Hu, J., M. Nakatani, L. A. García, A. Kuranouchi, and T. Fujimura. 2003. Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSR). *Breeding Sci.* 53: 297-304.
- Kasaian, J., J. Behravan, M. Hassany, S. A. Emani, F. Shahriani, and M. H. Khayyat. 2011. Molecular characterization and RAPD analysis of *Juniperus* species from Iran. *Genet. Mol. Res.* 10 (2): 1069-1074.
- Molseed, E. 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Piña-Escutia, J. L., L. M. Vázquez-García, and A. M. Arzate-Fernández. 2010a. Variety discrimination of *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. assessed by different length RAPD primers. *Electron. J. Biotechnol.* 13 (4): 1-7.
- Piña-Escutia, J. L., C. Vences-Contreras, M. G. Gutiérrez-Martínez, L. M. Vázquez-García, and A. M. Arzate-Fernández. 2010b. Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 44: 147-158.
- 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.
- Rentaría, A. M. 2011. Capítulo 18: Breve revisión de los marcadores moleculares. Parte III: Las herramientas

- moleculares. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed. Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. Argentina. 2010. pp: 541-566.
- Rodríguez, A., and L. Ortiz-Catedral. 2003a. *Tigridia graciellae* (Tigridieae: Iridaceae) a new species from México. Acta Bot. Mex. 64: 31-36.
- Rodríguez, A., y L. Ortiz-Catedral. 2003b. Tres nuevas localidades de Tigridias endémicas de México: *Tigridia bicolor*, *T. matudae* y *T. vanhouttei* ssp. *Roldanii*. Acta Bot. Mex. 62: 1-8.
- Valdés, de la C. M., Y. Hernández, A. Vázquez-Lobo, D. Piñeiro, and L. González-Pérez. 2010. Diversidad genética de especies silvestres del género *Nicotiana* II: Caracterización molecular mediante marcadores RAPD. Protección Veg. 25 (3): 166-173.
- Vázquez, G. L. M., M. T. H. Norman, y R. M. C. Corona. 2001. Oceloxóchitl *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. Colección: Ciencias naturales y exactas. Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. 69 p.
- Vidal-Barahona, A., E. L. Lagunas, M. E. Valadez, and G. Ortiz. 2006. Variabilidad morfológica y molecular de cultivares criollos y mejorados de frijol común en Tabasco, México. Rev. Fitotec. Mex. 29: 273-281.
- Weder, J. K. P. 2002. Influence of experimental conditions on the reproducibility of RAPD-PCR identification of legumes and cereals. Food Sci. Technol.-LEB. 35: 233-238.
- 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. 1995. Detection of section specific amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91: 830-835.
- Yamagishi, M., H. Abe, M. Nakano, and A. Nakatsuka. 2002. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. Sci. Hortic. 96: 225-234.
- Yeh, F. C., and T. J. B. Boyle. 1999. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. Belg. J. Bot. 129: 157.