

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



EFICIENCIA DE MARCADORES RAPD E ISSR, EN LA
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Tigridia* spp.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA

LEYVADELIA REYES MORALES

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESORES

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

MAYO, 2016

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", TOLUCA, MÉXICO.



ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivo general.....	4
1.3 Objetivos específicos.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen y distribución del genero <i>Tigridia</i>	5
2.2 Descripción morfológica.....	6
2.3 Especies del género <i>Tigridia</i> empleadas en el presente estudio.....	7
2.3.1 <i>T. martinezii</i> Calderón.....	7
2.3.2 <i>T. tepoxtlana</i> Ravenna.....	8
2.3.3 <i>T. alpestris</i> ssp. <i>alpestris</i>	10
2.3.4 <i>T. mariaetrinitatis</i> Espejo & López-Ferrari.....	11
2.3.5 <i>T. dugesii</i> S. Watson.....	12
2.3.6 <i>T. vanhoutei</i> ssp. <i>roldani</i>	13
2.3.7 <i>T. ehrenbergii</i> ssp. <i>Flaviglandifera</i>	14
2.3.8 <i>T. pulchella</i> B.I. Rob.....	15

2.3.9 <i>T. venusta</i> Cruden.....	16
2.4 Diversidad genética.....	18
2.5 Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares.....	18
2.6 Marcadores genéticos.....	21
2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
2.8 Polimorfismos de DNA Amplificados al Azar (RAPD).....	22
2.9 Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR).....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Ubicación del experimento.....	26
3.2 Material vegetal experimental.....	26
3.3 Análisis molecular.....	29
3.3.1 Extracción del DNA.....	29
3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
3.3.3 Condiciones de amplificación.....	31
3.3.4 Separación de los fragmentos amplificados.....	32
3.4 Análisis de datos.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 Análisis RAPD.....	34
4.2 Análisis ISSR.....	38
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Visión general de los diferentes tipos de marcadores.....	20
2. Datos de colecta de las nueve especies de <i>Tigridia</i> evaluadas en el presente estudio.....	27
3. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación en PCR del DNA nuclear de nueve especies de <i>Tigridia</i>	30

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>T. martinezii</i>	7
2. <i>T. tepoxtlana</i>	8
3. <i>T. alpestris</i> ssp. <i>alpestris</i>	10
4. <i>T. mariaetrinitatis</i>	11
5. <i>T. dugesii</i>	12
6. <i>T. vanhouteii</i> ssp. <i>Roldani</i>	13
7. <i>T. ehrenbergii</i> ssp. <i>flaviglandifera</i>	14
8. <i>T. pulchella</i>	15
9. <i>T. venusta</i>	16
10. Gel representativo de las bandas amplificadas con el iniciador NCDNA-3' ASSR20.....	34
11. Dendograma de nueve especies de <i>Tigridia</i> spp obtenido a partir de datos RAPD (a) y (b) ISSR basado en la distancia genética de Nei (1972) usando el método UPGMA	37

RESUMEN

EFICIENCIA DE MARCADORES RAPD E ISSR, EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Tigridia* spp.

Reyes Morales Leyvadelia. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Asesores. Dr. José Luis Piña Escutia¹. Dr. Amaury Martín Arzate Fernández².

^{1,2} Centro 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", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. ¹lpinae@uaemex.mx; ²arzatef@uaemex.mx

México es el centro de diversidad de las tigrídias, las cuales poseen un importante valor histórico, sin embargo es insuficiente la información que existe para determinar la variabilidad genética de esta especie. En el presente trabajo se utilizaron cinco iniciadores de polimorfismos de DNA Amplificados al azar (RAPD) y 5 iniciadores de Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) para caracterizar molecularmente a nueve especies de *Tigridia*. Como resultado se obtuvo un número total de bandas reproducibles de 40 utilizando RAPD, en comparación con las 54 bandas reproducibles utilizando ISSR. Se determinó que los iniciadores ISSR fueron más eficaces para detectar mayor porcentaje de polimorfismo (100 %), en comparación con los RAPD (96 %).

Palabras clave: *Tigridia*, iniciadores RAPD, ISSR, polimorfismo variabilidad genética.

SUMMARY

EFFICIENCY OF RAPD AND ISSR MARKERS IN THE *Tigridia* SPECIES IDENTIFICATION

Reyes Morales Leyvadelia. Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. Asesores.

Dr. José Luis Piña Escutia¹. Dr. Amaury Martin Arzate Fernandez².

^{1,2} Centro 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", C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. ¹jlpin@uaemex.mx; ²arzatef@uaemex.mx

Mexico is the center of diversity of tigrídiads, which have an important historical value however the information about genetic variability of this species is insufficient. In the present study five random amplified polymorphisms DNA (RAPD) and five Inter- Simple Sequence repeats (ISSR) primers were used to characterize molecularly nine species of *Tigridia*. As a result we obtained a total of 40 reproducible bands using RAPD, compared to 54 bands reproducible using ISSR. It was determined that the ISSR primers were more effective for detecting highest percentage of polymorphism (100%), in comparison with the RAPD (96%).

Key words: *Tigridia*, RAPD, ISSR primers, polymorphism genetic variability.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas silvestres de México son una fuente de riqueza genética de incalculable valor, de tal magnitud que pueden ser consideradas estratégicas para el país. Entre ellas se encuentran las especies del género *Tigridia*, quienes han representado para los mexicanos uno de los elementos bióticos más relevantes y de mayor significado cultural por su uso medicinal, ornamental, ceremonial y comestible (Vázquez-García, 2011).

Actualmente se conocen 43 especies y 6 subespecies, de las cuales, 41 son endémicas de nuestro país (Munguía-Lino *et al.*, 2015). Sin embargo aún se están integrando nuevas especies lo indica la necesidad de realizar estudios de diversidad genética de dichas especies con el objetivo de documentar su origen (Reyes-Díaz *et al.*, 2015).

Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009; y Valdés *et al.*, 2010 (citados por Reyes-Díaz *et al.*, 2015) señalan que una actividad que debe considerarse importante es la caracterización y conservación de los recursos fitogénéticos silvestres, para proteger y conservar el patrimonio genético vegetal (principalmente especies endémicas), y que al mismo tiempo, se pueda evaluar la adaptación de dichas especies a los posibles cambios climáticos o antropogénicos, contribuyendo así al conocimiento de la variabilidad genética entre especies y géneros, y

facilitando la selección de genotipos para el desarrollo de programas de protección y mejoramiento genético

La descripción morfológica ha permitido el estudio de la variabilidad genética e identificación de especies vegetales, sin embargo, hoy en día la incorporación de los análisis moleculares puede complementar la caracterización del germoplasma.

Dentro de los análisis moleculares, se encuentran los Polimorfismos de DNA Amplificados al Azar (RAPD), y las Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR). La técnica RAPD es relativamente sencilla y consiste en la amplificación de DNA al azar mediante el uso de *primers*, cebadores o iniciadores aleatorios, mostrando una alta sensibilidad para determinar variabilidad genotípica dentro de ciertas especies, además de generar un bajo costo de operación en comparación con otras técnicas moleculares (Vera *et al.*, 1999). Así mismo, la técnica ISSR, ha sido exitosamente utilizada para estimar la diversidad genética a nivel intra o inter-específico en diferentes especies cultivadas y silvestres (Arzate-Fernández *et al.*, 2005; Escandon *et al.*, 2005), debido a su rapidez, alta reproducibilidad y mayor eficiencia para detectar polimorfismos (Pradeep *et al.*, 2002).

Recientemente Reyes-Díaz y colaboradores (2015), reportaron la eficiencia de los marcadores RAPD e ISSR en la en la generación de polimorfismo y diferenciación genética de 15 especies del género *Tigridia*. En el presente trabajo, se utilizaron marcadores RAPD e ISSR, en la caracterización molecular de nueve especies silvestres del género *Tigridia* diferentes a las evaluadas previamente, a saber: *T. martinezii*, *T. tepoxtlana*, *T. alpestris* ssp. *alpestris*, *T. mariaetrinitatis*, *T. dugesii*, *T. vanhoutei* ssp. *roldani*, *T. ehrenbergii* ssp. *flaviglandifera*, *T. pulchella*, y *T. venusta*.

1.1 Hipótesis

Los marcadores RAPD e ISSR difieren en su eficiencia para generar polimorfismo entre nueve especies del género *Tigridia* spp.

1.2 Objetivo general

- Caracterizar molecularmente nueve especies del género *Tigridia* spp. mediante iniciadores de tipo RAPD e ISSR.

1.3 Objetivos específicos

- Determinar la eficiencia de los iniciadores RAPD e ISSR en la generación de polimorfismo entre las especies evaluadas.
- Comparar la longitud de los iniciadores RAPD en la generación de bandas polimórficas.
- Determinar los patrones genéticos de cada iniciador en las nueve especies del género *Tigridia* spp.
- Establecer las relaciones genéticas entre las nueve especies evaluadas, por cada iniciador y en conjunto.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución del género *Tigridia*

El género *Tigridia* comprende alrededor de 45 especies; de las cuales México es el mayor centro de diversificación, manteniendo alrededor de 27 especies, nueve subespecies (ssp.), una forma especial y nueve variedades de *Tigridia pavonia*; de las cuales 29 especies y seis subespecies son endémicas, el accidentado relieve y la diversidad climática presentes en el país han favorecido el desarrollo de estos endemismos (Rodríguez y Ortiz (2003a, 2003b) y (SINAREFI, 2009).

Espejo- Serna y López- Ferrari, (1996) mencionan que el género *Tigridia* se distribuye por todo el país, dentro de un intervalo altitudinal que va de los 2000 a los 3500 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque algunas pueden crecer a altitudes menores, pero nunca por debajo de los 500 msnm

En cuanto al ambiente en el que se desarrollan, el SINAREFI (2010a, 2010b) hace énfasis en que las tigrídias pueden vivir en diversos ambientes, principalmente en los bosques templados (bosque de encino –oyamel o pino- oyamel en alturas de 2400 a 3000 msnm), bosques tropicales caducifolios (altitudes entre 950 y 1800 msnm), palmares, llanos y pastizales.

2.2 Descripción morfológica

El tamaño de las tigridias es variado ya que va desde los 5 cm, como *T. martinezzi*, hasta 1.5 m o más, como *T. pavonia*; los tallos y el bulbo son cilíndricos, simples o ramificados; surgen de una yema o brote engrosado llamado bulbo con túnicas de color café; el bulbo también se considera como un tallo modificado del cual surgen las raíces que no son tan profundas, las hojas son simples con nervaduras paralelas, sin divisiones, márgenes enteros sin aserraduras, lineares, delgadas y envainantes en la base, las flores están dispuestas en inflorescencias en forma de ripidios de dos o más flores, cubiertas por dos brácteas envolventes subiguales; son erectas o pendulares. Las flores de tigridia presentan dos características en común; la primera es, lo efímero de su belleza, pues duran tan solo un día, y la segunda la gran variedad existente. Están compuestas de seis piezas llamadas tépalos que se encuentran libres y dispuestos en dos puntos de unión. El fruto es una capsula subglobosa, clavidiforme o elipsoide con tres carpelos o divisiones en el interior; en la punta están divididas en tres suturas por donde cae la semilla. La semilla está formada por un solo cotiledón, son globosas, aplanadas en los costados (Vázquez, 2011).

2.3 Especies del género *Tigridia* empleadas en el presente estudio

2.3.1 *T. martinezii* Calderón

Es una planta herbácea perenne, de hasta 75 cm de alto. Bulbo ovoide de alrededor de 3 cm de largo por 1 a 1.5 cm de ancho. Hojas linear-lanceoladas, plegadas, las basales de 30 a 75 cm de largo por 3 a 8 mm de ancho, las superiores de dimensiones menores. Espatas por lo general 1 o 2 por individuo, sobrepasadas considerablemente en largo por las hojas; valvas de la espata linear-lanceoladas, naviculares, de unos 3 cm de largo por mas-menos 0.4 cm de ancho, encerrado varias (hasta 4) flores. Flor erecta o patente (no péndula), saliendo a ras de la espata (sin pedicelo evidente), triangular en contorno general (vista de frente), hasta de 2 cm de ancho. Tépalos conniventes a modo de copa en la base, cortamente unguiculados en la base, en la parte distal extendidos o algo reflejos, a veces apiculados o retusos en el ápice, de color crema con puntos o líneas cortas morados o morado-cafés, dispuestos en la porción crateriforme; tépalos externos oblongos, de 1.5 a 1.7 cm de largo por mas-menos 7 mm de ancho; tépalos internos lanceolados de alrededor de 1 cm de largo por 3 a 4 mm de ancho, cada uno con glándula (superficie nectarífera) en su base, representada por un par de manchas blancas, ovales, convergentes en dirección al ápice. Tubo estaminal blanco, de 3 o 4 mm de largo, anteras

moradas, oblongas, de más-menos 3 mm de largo. Estilo sin mucrón entre sus ramas, éstas de más-menos 4 mm de largo, bífidas en el tercio superior. Cápsula madura oblongo, de 1.8 a 2.5 cm de largo por mas-menos 8 mm de ancho. Semillas subglobosas a piriformes, de unos 2 mm de largo, de color café claro (Figura 1) (Molseed, 1970).

Se desarrolla en zonas rocosas en presencia de *Agave*, *Dasyilirion* y *Echeveria*. Se encuentra a una altitud promedio de 2933 msnm. Su distribución se restringe al Estado de Hidalgo (Molseed, 1970).



Figura 1. *T. martinezii*. Fotografía: Guadalupe Munguía Lino

2.3.2 *T. tepoxtlana* Ravenna

Planta herbácea perenne bulbosa; bulbo ovoide de 1 cm de alto, las finas escamas de color marrón oscuro; tallo corto, 5-10 (16) cm de altura, varias hojas basales en la antesis, lineares, 25-40 cm de largo, 0.2-4 cm de ancho de la parte superior del tallo corto, hojas caulinares solitarias, surgen desde la base, cerca del tallo; brácteas de 2-3 cm de largo, 0.4-0.6 cm de ancho, adjuntando 2 a varias

flores; el ovario tiene óvulos sólo en la parte inferior central de 3 mm. Flores de 2-3 cm de diámetro, tépalos conniventes en la base; tépalos exteriores ovadas, 1.5-2 cm de largo, la mitad de ancho; tépalos internos color blanco con manchas color púrpura ampliamente ovado, 0.7-1.0 cm de largo, alrededor de 8 mm de ancho, la uña larga y estilizada; surco glandular en medio de tépalo; filamentos completamente unidos en la columna estrecha, 7 mm de largo, anteras de 4 mm ligeramente ascendente (Molseed, 1970).

Se desarrolla en bosques de pino-encino, en suelos limosos negros con alto contenido de materia orgánica. Se localiza a 2286 a 2534 (2410) msnm. Distribución restringida en el Estado de Morelos (Figura 2).



Figura 2. *T. tepoxtlana*. Fotografía: Aarón Rodríguez Contreras

2.3.3 *T. alpestris* ssp. *alpestris*

Planta herbácea perenne (Figura 3), bulbo grande (3-4 cm de largo), tallos robustos de hasta 60 cm de altura, de 2 a 3 ramas; espatas valvadas de 3-4 cm; tépalos externos ovado-elípticos, tépalos internos ovados, brevemente unguiculados, redondeados en la base, cóncavos, acuminados en el ápice, frecuentemente aserrados, de color morado y amarillo; glándula cordada invertida de 5.5 mm de ancho; columna estaminal de 6-7 mm de longitud, anteras oblongas-subuladas; ramas del estilo por encima de las anteras; cápsulas maduras elípticas (Molseed, 1970).

Se desarrolla en zonas rocosas cercanas a bosques de oyamel, bosques de pino-encino y pastizales. Se localiza a 2500 a 3500 (3000) msnm. Con distribución restringida en el Estado de Hidalgo.



Figura 3. *T. alpestris* ssp. *Alpestris* Fotografía: Guadalupe Munguía Lino

2.3.4 *T. mariaetrinitatis* Espejo & López-Ferrari

Planta herbácea perenne (Figura 4), de 25-40 cm de alto, glabro ovoide de 5 cm largo, 1.8-3 cm de ancho, más largo que el tallo floral, una hoja caulinar, lineal, 25 cm de largo, 4 mm de ancho, tallo floral a 40 cm de altura, ramificado sólo por encima de la hoja caulinar; ripidio de inflorescencia con espatas sub iguales, 6-8 cm de largo, 1 cm de ancho; pedúnculos 1.8-6 cm de largo, surcado; pedicelos linear-filiformes, de 4-8 cm de largo, 4-8 flores por ripidio, erecto, de 5-6 cm de diámetro, los tépalos conniventes en la base de la formación de copa poco profunda, extendiéndose distalmente, la base de pétalos amarillo brillante, exterior blanco-lila con manchas de color púrpura, elíptica u oblongo-elípticos, acuminados, 2.6-3 cm, 1.5-1.8 cm de ancho, tépalos internos de color amarillo con manchas de color púrpura, deltoides-unguiculados, 1 cm de largo, 1.2 cm de ancho, las glándulas dispuestas en la parte apical de los tépalos internos, semicircular, filamentos de 7-9 mm, anteras lineales, 9 mm de largo; ovario oblongo, 6 mm de largo, 3 mm de ancho, el estilo de 6-7 mm de largo, profundamente bífidas en dos brazos, rojo y el violeta; cápsula madura, 1.8-2.2 cm de largo, 1 cm de diámetro, semillas piriformes sub-globosas, 3 mm de diámetro (Molseed, 1970).

Se desarrolla en tipo de vegetación secundaria. Se localiza a 2380-2520 msnm.



Figura 4. *T. mariaetrinitatis* Fotografía: Espejo & López-Ferrari

2.3.5 *T. dugesii* S. Watson

Planta herbácea perenne, tallo de 9-13 cm de largo en la antesis; hojas basales ausentes o igual a la longitud del tallo en la antesis; espata valvada de dos y de color púrpura, 30-45 mm de largo y estrecho, adjuntando las flores 2-3 (Figura 5). Flores erectas, color amarillo, sostenidas por brácteas escariosas, 2-4 cm de diámetro, tépalos externos ovados con el manchas de color rojo y marrones; tépalos internos lance-oblongas, tépalos internos de dos tercios; tépalos ascendente; filamentos connados 3-5 mm de largo, anteras estrechas de 6-7 mm de largo; mucrón en los brazos del estilo muy reducido (Molseed, 1970).

Se desarrolla en bosque de pino-encino o bosque de encino perturbado. Se localiza a 2400 a 2600 (1644) msnm. Su distribución se encuentra en los estados de Jalisco y Zacatecas.



Figura 5. *T. dugesii* Fotografía: Azalia Hernández y Edgar Jardón

2.3.6 *T. vanhoutei* ssp. *roldani*

Planta herbácea perenne; bulbo grande, ovado-elípticos de 3-5 cm de ancho, las escamas de color marrón oscuro, tallo robusto. Altura de 65 cm, hojas basales caulinares con 50 cm de largo a 2.5 cm de ancho; lanceoladas y elípticas, las hojas basales caulinares inferiores mucho más grandes que las hojas caulinares superiores (Figura 6). Flores penduladas, campanuladas, de color amarillo pálido, con venas color marrón-púrpura, tépalos externos elípticos, obtusos de 2.5 cm de largo, tépalos internos esencialmente estrechos, orbiculares-óvalos, de 1.5-1.7 cm de largo; ramas del estilo bífidas, un mucro presente por debajo de las ramas del estilo (Molseed, 1970).

Se encuentra principalmente en lugares abiertos con suelos pocos profundos con presencia de matorrales de bajo porte algunos árboles, plantas herbáceas y presencia de agaves. Se localiza a 2200-2800 (2500) msnm. Se distribuye en los estados de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Molseed, 1970).



Figura 6. *T. vanhouteii* ssp. *roldani* Fotografía: Guadalupe Munguía Lino

2.3.7 *T. ehrenbergii* ssp. *flaviglandifera*

Planta herbácea, con tallos robustos de 73-118 cm de largo, 2-3 hojas caulinares de hasta 96 cm de largo, espatas valvadas (2) de 5-5.7 cm de largo; tépalos externos oblongos de 23-31mm de largo, de color paja con manchas púrpura; tépalos internos ovados de 11-14 mm de largo, área triangular por debajo de la glándula con rayas púrpuras, glándula de color amarillo; filamentos connados de 6-7.5 mm de largo, de color amarillo con morado, manchas en la base; anteras de 6-7.5 mm de largo, de color amarillo; estilo de 6.5-8.5 mm con ramas color amarillo; ovario pequeño (2.5-3.5 mm de largo); cápsula obovada de 20 mm de largo (Figura 7). Floración en septiembre (Cruden, 1975).

Se desarrolla en bosques de *Quercus*, en presencia de palmas, cycadas, *Aesclepi*, y *Cypura*. Se encuentra a una altitud promedio de 750 msnm. Se encuentra distribuida en los estados de Hidalgo y San Luis Potosí.



Figura 7. *T. ehrenbergii* ssp. *flaviglandifera* Fotografía: Luis Miguel Vázquez García

2.3.8 *T. pulchella* B.I. Rob

Planta herbácea perenne; bulbo avado-oblongo, 3-3.5 cm de largo, 1-1.5 cm de ancho, las escamas de color marrón oscuro; tallos de 40 cm de altura, hoja basal solitaria, linear-lanceoladas, de 40-50 cm de largo, 1.3-2, cm de ancho; hoja verdadera caulinar aproximadamente en medio del tallo, linear-lanceoladas, de 10-20 cm de largo, 3-5 mm de ancho, que subtiende 1 o 2 ramas; espata con valvas sub-iguales, lanceoladas, 4-5 cm de largo, 5-8 mm de ancho, adjuntando 2 a varias flores (Figura 8). Flores de 3 cm de diámetro, tépalos conniventes en la base; tépalos externos 2-2.5 cm de largo, 1 cm de ancho, las puntas de color rojo-marrón, con manchas en el borde de color blanco; tépalos internos blanco con marrón cerca del ápice, a lo largo unguiculados, hastados en la base, más ancho que largo y reniformes, 6-7 mm de largo, 1 cm de ancho, las bases y los lados de

los tépalos se encrespa hacia arriba para formar una bolsa grande, la punta de reflejos y mucronado; filamentos unidos en una columna completamente lineal 6-9 mm de largo, anteras de 5-6 mm de largo, ascendente; estilo se bifurcan medio su longitud, 3-4 mm de largo, falcadas entre las anteras; cápsulas maduras oblongo claviforme, 2-2.5 cm de largo, 6-8 mm de ancho (Molseed, 1970).

Se desarrolla en bosque de pino o de pino-encino. Se localiza de 1500 a 1800 (2239) msnm. Se distribuye en los estados de Jalisco y Michoacán.



Figura 8. *T. pulchella* Fotografía: Aarón Rodríguez Contreras

2.3.9 *T. venusta* Cruden

La altura del tallo floral al momento de la antesis es de 33-60 cm; 2 hojas caulinares, la inferior de 31-56 cm de largo, la superior un poco más reducida de 9-12 cm de largo, 2 valvas de la espata de 44 a 60 mm de longitud; Flores de 2-4

(6), erectas de 4 cm de ancho, copa blanca; tépalos externos oblongos de 22-25 mm de largo, de 10-11 mm de ancho, la porción más distal de color púrpura oscuro; tépalos internos ovados de 12 a 15 mm de largo y de 6-10 mm de ancho, uña de 0.5-1 (2) mm de largo, limbo reducido, 1-2 mm de ancho con manchas púrpuras; glándula de color crema, parcialmente cubierta por los márgenes del tépalo; filamentos connados de 4-5 mm de largo, anteras de 12-13 mm de largo, la parte media superior fértil; estilo ramificado de 9.5-11.5 mm de largo, dividido en su base; ovario de 4.5 mm de largo; cápsula estrechamente oblonga del 30 mm de largo y 5 mm de ancho (Figura 9). Florece de mediados de Agosto a mediados de Septiembre.

Se desarrolla en bosque de pinos, oyameles y encinos. Se localiza a 2900 msnm. Su distribución está restringida al estado de Michoacán (Molseed, 1970).



Figura 9. *T. venusta* Fotografía: Aarón Rodríguez Contreras y Luis Ortíz

Catedral

2.4 Diversidad genética

La diversidad genética se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos. El estudio de la diversidad es muy importante para la conservación, evaluación y utilización de los recursos genéticos (Franco *et al.*, 2001).

La variación genética de una población se puede medir a través de dos parámetros:

1. *La cantidad de heterocigotos que ésta presenta:* a esta medida se le denomina heterocigosis esperada (H_E), parámetro también conocido como “diversidad genética”.
2. *El porcentaje de loci polimórficos (%P),* es la proporción de *loci* en los cuales, el alelo más común se encuentra en una frecuencia menor o igual a 0.95.

2.5 Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares

Tanto en estudios teóricos de tipo evolutivo como en la utilización práctica de los marcadores moleculares es importante conocer dos de sus características: el carácter dominante o codominante de cada tipo de marcador, y el nivel de polimorfismo que genera. El carácter dominante o codominante determina el

nivel de facilidad con que pueden llevarse a cabo estimaciones de parámetros genéticos y evolutivos tan básicos y de uso generalizado. En el cuadro 1 se muestran las características de los diferentes tipos de marcadores (Astorga, 2008).

Cuadro 1. Visión general de los diferentes tipos de marcadores

Marcador	Abundancia	Nivel de polimorfismo	Especificidad de locus	Codominancia de alelos	Reproducibilidad	Intensidad de banda
Isoenzimas	Bajo	Bajo	Si	Si	Alto	Bajo
RFLP	Alto	Medio	Si	Si	Alto	Alto
Minisatelites	Medio	Alto	No/si	No/si	Alto	Alto
PCR-secuenciación	Bajo	Bajo	Si	Si	Alto	Alto
RAPD	Medio	Medio	No	No	Bajo	Bajo
Microsatelites	Alto	Alto	Si	Si	Alto	Bajo
ISSR	Medio	Medio	No	No	Medio-alto	Bajo
SSCP	Bajo	Bajo	Si	Si	Medio	Bajo-medio
CAPS	Bajo-medio	Bajo-medio	Si	Si	Alto	Bajo- medio
SCAR	Medio	Medio	Si	Si/no	Alto	Bajo
AFLP	Medio	Medio	No	No/si	Alto	Medio
TaqMan	Bajo		Si	No/si	Alto	Bajo

(IPGRI y Cornell University, 2003)

2.6 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos moleculares son segmentos de DNA que se utilizan para el análisis genómico (Caetano-Anollés, 1994). Estos segmentos usualmente representan variantes de sitios polimórficos que pueden ser identificados utilizando estrategias generales como la hibridación molecular o la amplificación enzimática del DNA (Otero *et al.*, 1997). Los marcadores de DNA se han utilizado en la identificación de organismos y en la construcción de mapas genómicos (Sunnucks, 2000; Otero *et al.*, 1997).

Los marcadores de DNA están conectados integralmente con el éxito en el mejoramiento molecular. Otero *et al.*, (1997), señalan que fue a partir de Mendel en 1866 cuando se empezó a formalizar el conocimiento empírico para posteriormente transformarse en genético. Con la búsqueda de marcadores ha incrementado nuestro conocimiento sobre las bases genéticas de la herencia (Otero *et al.*, 1997; Winter y Kahl, 1995).

Un marcador genético debe ser: a) altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, b) de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), c) insensible a los efectos ambientales, d) codominante, e) de rápida

identificación y simple análisis y f) de posible detección de los estadios tempranos del desarrollo de una planta.

2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios, 2013).

2.8 Polimorfismos de DNA Amplificados al Azar (RAPD)

Basada en la PCR se ha desarrollado una metodología que se conoce como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar) (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990). Esta técnica se basa en

la utilización de un cebador de pequeño tamaño, generalmente 10 nucleótidos, y de secuencia arbitraria por lo que no requiere el conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar. De esta manera multitud de fragmentos son amplificados con cada grupo de cebadores en cada genoma. La técnica RAPD presenta una serie de ventajas con respecto a otros marcadores moleculares para el estudio poblacional de organismos muy desconocidos genéticamente (Black, 1993):

- No requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN,
- Es un método rápido, sencillo y con costos inferiores a los de otras técnicas,
- Permite analizar un número elevado de muestras en un tiempo reducido,
- Se necesitan cantidades mínimas de ADN molde,
- No se utiliza radiactividad,
- Revela un elevado grado de polimorfismo debido al gran número de *loci* que permite estudiar, muchos de los cuales se piensa que son no codificantes (Williams *et al.*, 1990).

No obstante, los RAPD tienen también algunos inconvenientes (Black, 1993). En su mayor parte presentan una herencia dominante y, la principal objeción a la que se enfrenta esta técnica, es el problema de la reproducibilidad, por lo que se hace necesaria una estricta estandarización de las condiciones de amplificación, así como llevar a cabo réplicas de todas las amplificaciones para una completa fiabilidad.

2.9 Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSRs)

Los microsatélites del tipo Inter secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés Inter-Simple-Sequence-Repeat), son una variante de la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - ADN polimórfico amplificado al azar), aunque probablemente son más rigurosos que ésta debido a la alta temperatura de alineamiento utilizada (Robinson y Harris, 2000). La amplificación ISSR es una técnica que puede diferenciar rápidamente individuos relacionados estrechamente.

Involucra la amplificación por PCR del ADN usando un único iniciador compuesto de una secuencia de microsatélite anclado al extremo 3' ó 5' por 2 - 4 nucleótidos arbitrarios y a menudo degenerados. La amplificación ISSR puede revelar muchos más fragmentos por iniciador que los RAPDs (García, 2012).

Los marcadores ISSR tienen la ventaja de generar grandes cantidades de bandas, por lo cual pueden distinguir accesiones relacionadas estrechamente de manera más confiable que otras técnicas y son menos caros que los RFLP ó RAPD (García, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México; ubicado en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, México.

3.2 Material vegetal experimental

Como material vegetal se utilizaron hojas frescas de nueve especies silvestres del género *Tigridia*, actualmente se ubican en el Centro de Conservación de Especies Silvestres, del Centro Universitario Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los datos de colecta se indican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Datos de colecta de las nueve especies de *Tigridia* evaluadas en el presente estudio.

Género y especie	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Comunidad y tipo de vegetación
<i>T. alpestris</i> ssp. <i>alpestris</i>	20°58'56".0	99°24'32".9	3000	Mineral del Monte, Hidalgo. Claro rocoso en bosque de encino-pino
<i>T. dugesii</i>	20°44'.0	100°33'.0	1644	La Primavera, Zapopan, Jalisco. Llano en bosque de pino-encino
<i>T. ehrenbergii</i> ssp. <i>flaviglandifera</i>	21°00'29".8	99°10'46".4	1562	Jacala, Hidalgo. Claro rocoso en bosque de juniperus
<i>T. mariaetrinitatis</i>	17°02'01"	97°34'49"	1450	Chalcatongo, Oaxaca. A un lado de cultivo de maíz

<i>T. martinezii</i>	20°58'56".0	99°24'32".9	2933	Mineral del Monte, Hidalgo. Claro rocoso en bosque de encino-pino
<i>T. pulchella</i>	19°54'10'.8	102°59'41".2	2239	Mazamitla, Jalisco. Bosque de pino-encino
<i>T. tepoxtlana</i>	19°00'.468	99°15'.865	2410	Tepoztlán, Morelos. Claro rocoso en bosque de encino
<i>T. vanhouttei</i> ssp. <i>roldanii</i>	19°38'90'.5	99°38'90'.5	2500	Tlaxco, Tlaxcala. Claro rocoso en bosque de encino
<i>T. venusta</i>	19°40'.754	100°51'.736	2900	Querendaro, Ladera de bosque de pino-encino

Fuente: Vázquez–García, 2015. Comunicación personal

3.3 Análisis molecular

3.3.1 Extracción del DNA

El DNA genómico fue extraído de aproximadamente 100 mg de tejido fresco de hoja de cada una de las nueve especies de *Tigridia*, mediante el método CTAB (Cetil-trimetil bromuro de amonio) reportado por Zhou *et al.* (1999). Una vez extraído el DNA y resuspendido en 50 μ L de buffer de TE (10 mM de Tris-HCl con 1 mM EDTA pH 7.0) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L y se emplearon 10 iniciadores de dos tipos: 5 iniciadores RAPD, y cinco iniciadores ISSR (Cuadro 3).

Cuadro 3 Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación en PCR del DNA nuclear de nueve especies de *Tigridia*.

Nombre del iniciador	Tipo	Secuencia (5'→ 3')	Número de bases	Tamaño de fragmentos amplificados (bp)	TAF	PB	PB (%)
*Y24	RAPD	AACCGCGCTC	10	100-2000	14	8	57
*Y37	RAPD	TAACCGCGCC	10	200-1500	13	5	38
*Y38	RAPD	TAACCGCGCC	10	200-1500	18	7	39
*Y41	RAPD	GCGTCCTGGG	10	200-1700	18	10	55
**NCDNA-3'ASSR02	ISSR	(CT) ₇ ATC	17	300-1500	12	6	50
**NCDNA-3'ASSR15	ISSR	(CT) ₇ ATG	17	200-1350	15	8	53
**NCDNA-3'ASSR20	ISSR	(CT) ₇ GCA	17	400-1750	24	12	50
**NCDNA-3'ASSR29	ISSR	(CT) ₇ GTA	17	300-1400	22	13	59
**NCDNA-3'ASSR35	ISSR	(CT) ₇ TGA	17	300-1200	19	15	79

TAF: Número total de fragmentos amplificados

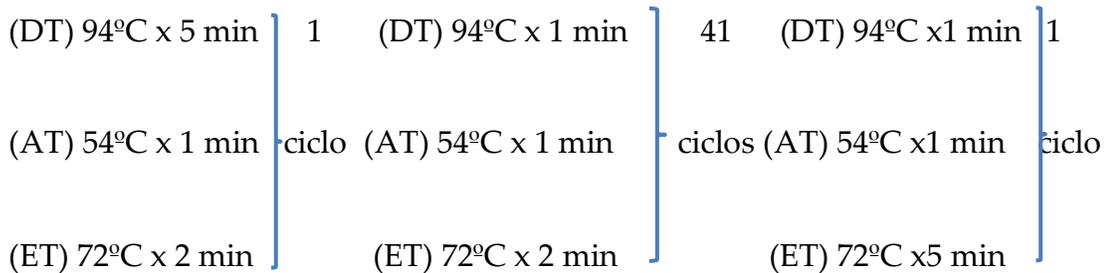
PB: Número de bandas polimórficas

Fuente: *Yamagishi (1995), **Yamagishi *et al.* (2002).

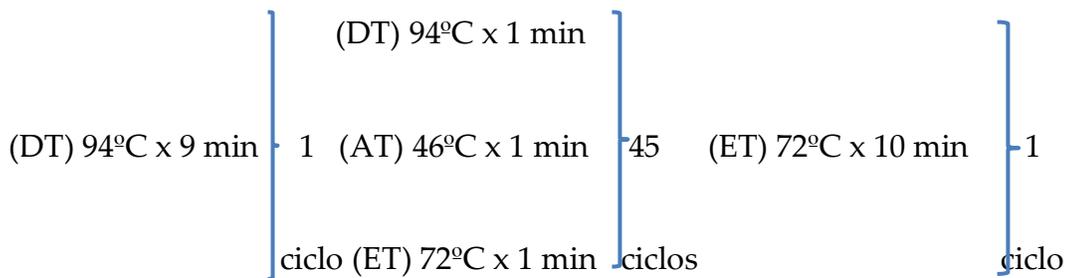
3.3.3 Condiciones de amplificación

A continuación se presentan las condiciones de amplificación para cada uno de los iniciadores RAPD e ISSR; se describen la Temperatura de Desnaturalización (DT), la Temperatura de Alineación (AT) y la Temperatura de Elongación o extensión (ET) para cada ciclo de reacción.

a) Iniciadores RAPDY24, Y37, Y38 e Y41:



b) Iniciadores ISSR 3'-ASSR02, 3'-ASSR15, 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 y 3'-ASSR35:



3.3.4 Separación de los fragmentos amplificados

La separación de los fragmentos de DNA se realizó en cámaras de electrofóresis horizontal, usando un gel de agarosa tipo II al 1 %, al cual se le adicionaron 3 μ L de bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en los pozos del gel con un volumen final de 6 μ L, que contenían 3 μ L del producto de PCR y 3 μ L del marcador de carga azul de bromofenol (BPB) para observar el corrimiento de los fragmentos de DNA. Las muestras fueron flanqueadas con un marcador escalera (100-3000 pb) para medir el tamaño de los fragmentos amplificados. Las condiciones de corriente eléctrica se realizaron a 80 V y 120 mA durante 80 min. Las bandas amplificadas fueron visualizadas en un Transluminador marca UVP™ modelo MP20 (P/N 95-0398-01).

3.4 Análisis de datos

Los patrones de bandeo resultantes de los análisis de iniciadores RAPD e ISSR se utilizaron para generar una Matriz Binaria de Datos (MBD) donde se consideró la presencia de una banda como “1” y la ausencia de la misma, como “0”; para este análisis sólo se contemplaron las bandas completamente claras. La MBD se utilizó para generar la caracterización molecular de las nueve especies del género *Tigridia* evaluadas. Para cada uno de los análisis (RAPD e ISSR), los parámetros que se consideraron fueron:

1. La variabilidad genética se evaluó estimando el porcentaje de polimorfismo (%P) y la heterocigocidad esperada (H_E).

$$h_j = 1 - p^2 - q^2$$

2. La diferenciación genética se estimó a través de los valores de distancia genética (D_G).

Los parámetros evaluados se estimaron mediante el programa POPGENE (versión 1.2) (Raymond y Rousset, 1995), del cual también se obtuvieron los dendrogramas correspondientes para cada uno de los análisis.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis RAPD

Reyes-Díaz (2015), realizó un estudio para caracterizar 15 especies de *Tigridia*, mediante el uso de marcadores RAPD de 10, 15 y 20 bases. De acuerdo a sus resultados, los RAPD de 10 bases fueron más eficientes para detectar polimorfismo y para diferenciar genéticamente a las especies evaluadas (Figura 10).

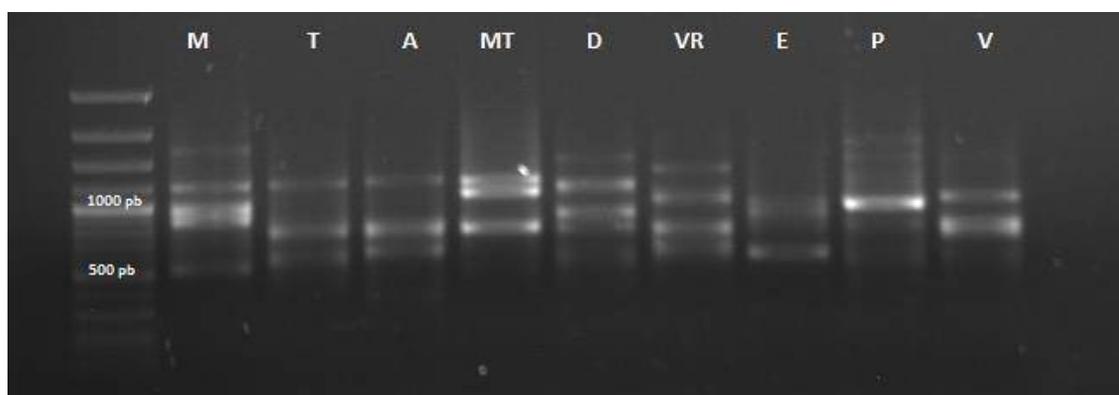


Figura 10. Gel representativo de las bandas amplificadas con el iniciador NCDNA-3'ASSR20, se muestra a los lados el marcador de peso molecular (MPM), siendo (M) *T. Martinezii*, (T) *T. Tepoxtlana*, (A) *T. Alpestris* spp. *Alpestris*, (MT) *T. Mariatrinitatis*, (D) *T. Dugesii*, (VR) *T. Vanhoutei* ssp. *Roldani*, (E) *T. Ehrenbergii* spp. *Flaviglandifora*, (P) *T. pulchella*, (V) *T. venusta*.

Resultados similares fueron encontrados en ésta investigación, donde los marcadores RAPD resultaron ser una útil herramienta para distinguir a cada una de las nueve especies de *Tigridia*.

Con los cinco iniciadores RAPD, el número total de bandas reproducibles fue de 40; de las cuales, 39 fueron polimórficas, con un promedio de 7.8 bandas por iniciador. El porcentaje de polimorfismo obtenido, varió del 80 al 100%, con un promedio de 96 % por iniciador.

El valor promedio de heterocigosis esperada para los marcadores RAPD fue de $H_E = 0.27$. El dendrograma generado de los datos RAPD (Figura 10), ubicó a las especies en tres grupos diferentes. En el grupo I se ubicaron las especies: *T. martinezii*, *T. mariaetinitais*, *T. vanhoutei* ssp *roldani*, y *T. tepoxtlana*, entre las cuales, no se encontró correlación con su fenología o ubicación geográfica.

En el grupo II estuvieron las especies *T. alpestris* ssp *alpestris*, *T. dugesii*, *T. venusta*, y *T. pulchella*. Es interesante notar que a pesar de provenir de diferentes estados de la República Mexicana, estas especies tienen un hábitat similar de bosque de pino-encino, por lo que quizá esta característica haya permitido su agrupación, pues se ha observado que la diferenciación genética de especies silvestres puede estar influenciada por la homogeneidad del hábitat en el que se desarrollen (Liu *et al.*, 2011; Rodríguez-Bernal *et al.*, 2012).

Finalmente en el grupo III la especie *T. ehrenbergii* ssp *flaviglandifera* estuvo prácticamente separada del resto. Esta especie se localiza a la menor altitud (750 m) (Cruden, 1975), por lo que es posible que esto haya contribuido a su marcada diferenciación, pues se sabe que poblaciones de altitudes menores pueden mostrar limitación del flujo de genes, y tamaño de población, reduciendo así la variación genética e incrementando la diferenciación de poblaciones (Lesica y Allendorf 1995 citados por Ohsawa y Ide (2007)).

La distancia genética promedio entre las nueve especies fue $D_G = 0.37$. Las especies menos emparentadas fueron *T. vanhoutei* ssp *roldani* y *T. venusta*, al presentar el valor más alto de $D_G = 0.55$, mientras que la más alta asociación genética se encontró entre las especies *T. alpestris* ssp *alpestris* y *T. dugesii*, con un valor de $D_G = 0.19$.

4.2 Análisis ISSR

Los marcadores ISSR han sido exitosamente utilizados para estimar la diversidad genética en un amplio rango de especies silvestres y cultivadas, tales como jacaranda (Escandón *et al.*, 2005), citronella (Bhattacharya *et al.*, 2010), lily (Arzate-Fernández *et al.*, 2005), y ginseng (Li *et al.*, 2011). En la presente investigación, resultados similares fueron observados, y con el uso de iniciadores ISSR, fue posible diferenciar a las nueve especies de *Tigridia* estudiadas.

Con los cinco iniciadores ISSR, el número total de bandas reproducibles fue de 54, siendo todas polimórficas. Ésta alta eficiencia en la generación de polimorfismo puede deberse a la secuencia motivo de los iniciadores utilizados (Cuadro 2), pues se ha reportado que la secuencia CT produce mayor polimorfismo que la secuencia AT (Hu *et al.*, 2003). Esto hace a los marcadores ISSR altamente informativos, rápidos y confiables para la diferenciación genética de especies de *Tigridia*, como también ha sido reportado por Piña-Escutia *et al.*, (2010) y Reyes-Díaz *et al.*, (2015). Nuestros resultados también sugieren que la secuencia CT puede ser muy abundante en el genoma de especies silvestres ornamentales, debido a que los iniciadores usados en éste estudio, también han sido útiles para determinar la diversidad genética en otras

especies silvestres ornamentales como *Lilium maculatum* (Arzate-Fernández *et al.*, 2005), *Sprekelia formosissima* (Bautista-Puga *et al.*, 2011) y *Cosmos* spp (Rodríguez-Bernal *et al.*, 2012).

El valor promedio de heterocigosis esperada para los marcadores ISSR fue de $H_E = 0.28$. El dendrograma generado de los datos ISSR (Figura 10b), ubicó a las especies en tres grupos diferentes. En el grupo I se ubicaron las especies: *T. martinezii*, y *T. pulchella*. En el grupo II estuvieron las especies *T. tepoxtlana*, *T. venusta*, *T. alpestris* ssp *alpestris*, y *T. vanhoutei* ssp *roldani*.

Finalmente en el grupo III se agruparon las especies *T. mariaetrinitatis*, *T. ehrenbergii* ssp *flaviglandifera*, y *T. dugesii*. Es importante destacar que estas especies sólo se encuentran en los estados de Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí, Jalisco, y Zacatecas, respectivamente, lo cual sugiere que la separación marcada de las mismas, respecto al resto de las especies, puede ser consecuencia de su ubicación geográfica, así como de su distribución restringida.

La distancia genética promedio entre las nueve especies fue $D_G = 0.39$. Las especies menos emparentadas fueron *T. mariaetrinitatis* y *T. dugesii*, al presentar el valor más alto de $D_G = 0.58$, mientras que la más alta asociación genética se encontró entre las especies *T. alpestris* ssp *alpestris* y *T. vanhoutei* ssp *roldani*, con un valor de $D_G = 0.20$.

Nybom (2004) menciona que cuando se utilizan marcadores dominantes, las estimaciones de la diversidad genética y diferenciación de poblaciones suelen ser bastante similares y estrechamente correlacionadas. En este estudio, se encontraron resultados similares, ya que el polimorfismo obtenido con los marcadores RAPD fue de 96 %, y la $H_E = 0.27$, mientras que para los marcadores ISSR, estos valores fueron de 100 %, y 0,28, respectivamente, lo que indica la presencia de una alta diversidad genética entre las especies analizadas.

Se sabe que el sistema de apareamiento, y el modo de reproducción afectan significativamente la extensión y distribución de la diversidad genética. En especies semi-incompatibles, se incrementa la homocigosis, originando bajos niveles de variación genética, mientras que las especies con un sistema de polinización abierto exhiben mayores niveles de variación. En el caso de las especies de *Tigridia*, son plantas alógamas, y algunas de ellas presentan un sistema genético de autoincompatibilidad el cual favorece la polinización cruzada (Molseed, 1970). Por lo tanto, los altos valores de diversidad genética encontrados en éste estudio pueden ser explicados por el sistema de apareamiento, y el modo de reproducción de las especies evaluadas. Nuestros resultados son similares a los reportados en estudios previos sobre especies silvestres como *Liparis* (Chung *et al.*, 2007), y *Tadehagi* (Liu *et al.*, 2011), donde también fue reportado un alto nivel del diversidad genética.

El buen manejo y conservación de las poblaciones de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción dependen de una comprensión completa de las especies, incluyendo los niveles y la estructura de la variación genética (Wallace, 2002 citado por Arzate-Fernández et al., 2005). Desde una perspectiva ecológica, los resultados de éste estudio indican que la diferenciación genética de las especies de *Tigridia* es necesaria para su conservación en su hábitat natural, pero además, es posible la recolección de germoplasma con un enfoque de conservación *ex situ*, o de mejoramiento genético con miras a tener materiales seleccionados con características ecológicas, morfológicas o agronómicas (potencial ornamental) de interés.

V. CONCLUSIONES

1. Los iniciadores RAPD e ISSR mostraron polimorfismo entre las nueve especies del género *Tigridia* analizadas, y permitieron la caracterización de cada una de ellas.
2. Con ambos marcadores, se encontraron niveles altos de diversidad genética entre las especies analizadas, con valores de $H_E = 0.27$ y 0.28 para RAPD e ISSR respectivamente.
3. Los iniciadores ISSR fueron más eficientes al presentar un mayor porcentaje de polimorfismo (100 %), en comparación con los RAPD (96 %).

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arzate-Fernández, A. M., Miwa, M., Shimada, T., Tonekura, T., Ogawa, K. (2005). Genetic diversity of miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *Bukosanense*), an endemic endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biology* 20: 57-65.
- Astorga, M.P. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. Taller Técnico Regional de la FAO. 277–287.
- Bautista-Puga, M. D., Vázquez-García, L. M., Leszczynska-Borys, H., Borys, M. W., Arzate-Fernández, A. M. (2011). Characterization of aztec lily through morphological and molecular markers. *Agrociencia* 45: 413-422.4.
- Bhattacharya, S., Bandopadhyay, T. K., Ghosh, P. D. (2010). Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of molecular diversity in elite germplasm of *Cymbopogon winterianus* across West Bengal, India. *Emirates Journal Food Agriculture* 22 (1): 13-24.
- Black, W.C. (1993). PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.* 2, 1-5

- Caetano-Anollés (1994). MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Molecular Biology* 25: 1011-1026.
- Chung, M. Y., Park, C. W., Myers, E. R., Chung, M. G. (2007). Contrasting levels of genetic diversity between the common, self-compatible *Liparis kumokiri* and rare, self-incompatible *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in South Korea. *Botanical Journal Linnean Society* 153 (1): 41-48
- Cruden, W. R. (1975). New Tigridiae (Iridaceae) from Mexico. *Brittonia* 27: 103-109.
- Escandón, A. S., Pérez de la Torre, M., Acevedo, A., Marucci-Poltri, S., Mijayima, I. (2005). Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. *Acta Horticulturae* 683: 121-127
- Espejo-Serna, A. y Lopez-Ferrari, A. R. (1996). Comentarios florísticos ecológicos sobre las iridáceas mexicanas. *Acta Botanica Mexicana*. 34: 25-47.
- Franco, J., Crossa, J., Ribaut, M., Betran, J., Warburton, M. L., and Khairallah, M. (2001). A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 944-952

- García N. L. C. (2012). Caracterización morfológica y molecular de 34 colectas nativas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Maestría en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56p.
- Gutiérrez-Díez, A., Martínez-de la Cerda, J., García-Zambrano, E. A., Iracheta-Donjuan, L., Ocampo-Morales, J. D. y Cerda-Hurtado, I. M. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32 (1): 9-18
- Hu, J., Nakatani, M., García, L. A., Kuranouchi, T., Fujimura, T. (2003). Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science* 53: 297-304
- Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) y Cornell University. (2003). "Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module", editada por M.C. de Vicente, C. López y T. Fulton.
- Li, S., Li, J., Yang, X. L., Cheng, Z. (2011). Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetic Resources & Crop Evolution* 58: 815-824.

- Liu D, He X, Liu G and Huang B (2011). Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Tadehagi* in southwest China evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Genet. Resour. Crop Evol.* 58: 679-688.
- Molseed, E. (1970). The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.
- Munguía-Lino, G.; Vargas-Amado, G.; Vázquez-García, L. M.; Rodríguez, Aarón (2015). "Riqueza y distribución geográfica de la tribu Tigridieae (Iridaceae) en Norteamérica". *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 1: 80-98.
- Nei, M. (1972). Original measures of genetic identity and genetic distance genetic. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Ohsawa, T., Ide, Y. (2007). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*. 1-12.

- Picca, A., Helguera, M., Salomon, N. y Carrera, A (2004). Parte II, capítulo 4: Marcadores moleculares, en Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 61-68.
- Piña-Escutia, J. L., Vences-Contreras, C., Gutiérrez-Martínez, M G., Vázquez-García, L. M. y Arzate-Fernández, A. M. (2010). Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.f.) DC. *Agrociencia* 44: 147-158
- Pradeep, R. M., Sarla, N. y Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (versión 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249.
- Reyes-Díaz, J. I.; Arzate-Fernandez, A. M.; Piña-Escutia, J. L.; Vazquez-Garcia L. M. (2015). Comparative Study of the Discriminating Capacity of DNA Markers and Their Effectiveness in Establishing Genetic Relationships in the Genus *Tigridia*. *Agrociencia*. 49 (4):361-372.
- Robinson, J.; Harris, S. A. (2000). A chloroplast DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acaciaeae, Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 132:195-222.

- Rodriguez, A. y Ortiz- Catedral, L. (2003 b). Tres nuevas localidades de Tigridias endemicas de Mexico: *Tigridia bicolor*, *T. matudae* y *T. vanhouttei* ssp. *Roldanii*. Acta Botanica Mexicana. 62: 1-8.
- Rodriguez, A. y Ortiz-Catedral, L. (2003 a). *Tigridia graciela* (Tigridieae: Iridaceae) a new species from México. Acta Botánica mexicana. 64: 31-36.
- Rodriguez, C. A, (1999). Estudio sistematico y ecologico del genero *Tigridia* (Iridaceae). Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Informe final SNIB-CONBIO proyecto No. J089. México. s.p.
- Rodríguez-Bernal, A., Piña-Escutia, J. L., Vázquez-García, L. M., Arzate-Fernández, A. M. (2012). Genetic diversity of seven *Cosmos* species revealed by RAPD and ISSR markers. Genetics and Molecular Research. In press.
- SINAREFI (Sistema Nacional de recursos Fitogenéticos para Alimentación y la Agricultura) (2010 a). Distribución del genero *Tigridia* en el Estado de México. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas; Sociedad Mexicana de Fitogenetica y Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. 31 p.

- SINAREFI (Sistema Nacional de recursos Fitogenéticos para Alimentación y la Agricultura). (2009). Situación actual de las Tigrídias en México y Estrategias de Acción. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de semillas. 55p.
- SINAREFI (Sistema Nacional de recursos Fitogenéticos para Alimentación y la Agricultura). (2010b). Tigrídias ornamentales, uso y conservación. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de semillas; Sociedad Mexicana de Fitogenética y Sistema Nacional de recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 33p.
- Sunnucks, P., (2000). Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology & Evolution, vol. 15, no 5, 199-203.
- Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C., (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad 2 (2): 70-78
- Valdés, de la C., M., Hernández, Y., Vázquez-Lobo, A. Piñeiro, D. y González-Pérez, L. (2010). Diversidad genética de especies silvestres del

género *Nicotiana* II: Caracterización molecular mediante marcadores RAPD.

Protección Vegetal 25 (3): 166-173

- Vázquez-García. L. M (2011). Tigrídias ornamentales, uso y distribución. Universidad Autónoma Chapingo. México. 106 p.
- Vera, M. C., Paredes, C. M. y Becerra, V. B. (1999). Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimática y RAPD dentro y entre clases comerciales de frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L). Agricultura Técnica 59 (4): 247-259.
- Welsh J., McClelland M (1990). Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218
- Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. (1990). DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535
- Winter P and Kahl G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11: 438-448.
- Yamagishi, M. (1995). Detection of section specific amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. Theoretical and Applied Genetics 91: 830-835.

- Yamagishi, M., Abe, H., Nakano, M. y Nakatsuka, A. (2002). PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae* 96: 225-234.
- Yeh, F. C. y Boyle, T. J. B. (1999). Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgium Journal of Botany* 129: 157.
- Zhou, Z., Miwa, M., Hogetsu, T. (1999). Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist* 144: 55-63.

