



Analysis of morphological characters and RAPDs fragments of twelve species of the *Crassulaceae* Family

Análisis de caracteres morfológicos y fragmentos RAPDs de doce especies de la Familia *Crassulaceae*

Andrade-Rodríguez, M.¹, Rodríguez-Rojas, T. J.*¹, Castillo-Gutiérrez, A.²,
Villegas-Torres, O. G.¹, Guillén-Sánchez, D.¹.

¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62210, México.

²Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc.
Av. Nicolás Bravo s/n, Parque Industrial Cautla, C.P. 62717 Xalostoc, Ayala, Morelos. México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Andrade-Rodríguez, M., Rodríguez-Rojas, T.J., Castillo-Gutiérrez, A., Villegas-Torres, O.G., Guillén-Sánchez, D. (2019). Analysis of morphological characters and Rapd fragments of twelve species of the *Crassulaceae* Family. *Revista Bio Ciencias* 6, e537. doi:
<https://doi.org/10.15741/revbio.06.e537>



ABSTRACT

The *Crassulaceae* family is the most representative of Mexico due to the high endemism of most of its species and to its historical-cultural significance. They are prized and valued on the international market, causing an intense and illegal harvest and sacking of plants, fruits and seeds, with the purpose of selling and recording them in other countries. Morphological characteristics are used to study genetic diversity, to identify cultivated plants and the method of molecular characterization measures genetic variability and diversity with the purpose of conservation and protection of genetic resources. On that basis, the objective of this research work was the morphological and molecular characterization by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) of twelve species of the *Crassulaceae* family. Twelve species of the family *Crassulaceae* were studied: *Echeveria runyonii*, *E. perle*, *E. agavoides*, *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther.*, *E. elegans*, *E. pulvinata*,

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 25th 2018.

Accepted/Aceptado: October 18th 2018.

Available on line/Publicado: March 21st 2019.

RESUMEN

La familia *Crassulaceae* es la más representativa de México debido al alto endemismo de la mayoría de sus especies y por su significado histórico-cultural; son cotizadas y valoradas en el mercado internacional, esto ha provocado una intensa recolecta y saqueo de plantas, frutos y semillas de manera ilegal, con fines de venta y registro en otros países. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas y el método de la caracterización molecular mide la variabilidad genética y la diversidad genética con la finalidad de conservar y proteger los recursos genéticos. Con base en lo anterior, el objetivo de la investigación fue la caracterización morfológica y molecular mediante RAPD (Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico) de doce especies de la familia *Crassulaceae*. Se estudiaron doce especies de la familia *Crassulaceae*, *Echeveria runyonii*, *E. perle*, *E. agavoides*, *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther.*, *E. elegans*, *E. pulvinata*, *E. derembergii*, *E. setosa*, *Pachyphytum oviferum*, *Sedum clavatum*, *S. nussbaumerianum*, y *S. palmeri*, las cuales son especies endémicas. Para la caracterización morfológica se usaron algunas características utilizadas para la descripción de plantas de algunas especies de la familia *Crassulaceae*. Se realizó la caracterización molecular

*Corresponding Author:

Rodríguez-Rojas, Teresa de Jesús. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 1001, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos; México. Phone: +52(777) 233 6204 . E-mail: teresa.rodriguez@uaem.mx

E. derembergii, *E. setosa*, *Pachyphytum oviferum*, *Sedum clavatum*, *S. nussbaumerianum*, and *S. palmeri*, which are endemic species. For morphological characterization, some characteristics used for plant description of some species from the *Crassulaceae* family were employed. Molecular characterization was performed by RAPD. Data were processed using the Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System (NTSYSpc 2.1). Quantitative characters separated the twelve species into five groups according to the cluster analysis. Six groups were obtained with the RAPD analysis. The most genetically similar species were: *E. runyonii* and *E. derembergii*, indicating more genetic crossing possibilities for interspecific hybridization.

KEY WORDS

Endemic species, Morphological and molecular analysis, clustering, multivariate analysis.

Introducción

The *Crassulaceae* family is the most representative of Mexico due to the high endemism of most of its species and to its historical-cultural significance and for the role they play in the structure and function of arid ecosystems of the country (Toledo, 1988); they present a high genetic diversity, which appears with variation in plant height, size, shape, thickness and color of the leaves, size and shape of the inflorescence (Borys *et al.*, 2005).

Mexico is considered as the second center of diversity with a representation of approximately 300 (89.9 %) endemic species (t' Hart, 1997), being this percentage of endemism the highest among families and genera in this country (Thiede, 1995). Mexico is an important place of high diversity in vegetal species (Colinas, 2003).

Due to the incomparable shape and beauty of its flowers, *Crassulaceae* are prized and valued on the international market; the aforementioned causes an intense and illegal harvest and sacking of plants, fruits and seeds, with the purpose of selling and recording them in other countries (Bravo-Hollis, 1978). Conservation and use of genetic resources is of strategic importance for humanity; the different vegetal species have been submitted to an active interaction with the environment, which caused a high number of genotypes adapted to different local conditions, expanding genetic diversity (Becerra & Paredes, 2000).

mediante RAPD. Los datos se procesaron utilizando el Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYSpc 2.1). Los caracteres cuantitativos separaron a las doce especies en cinco grupos según el análisis de conglomerados. Se obtuvieron seis grupos con el análisis RAPDs. Las especies con mayor similitud genética fueron: *E. runyonii* y *E. derembergii*, lo que indica mayor posibilidad genética de cruzamiento para hibridación interespecífica.

PALABRAS CLAVE

Especies endémicas, Análisis morfológico y molecular, agrupamiento, y análisis multivariado.

Introducción

La familia *Crassulaceae* es la más representativa de México, debido al alto endemismo de la mayoría de sus especies, por su significado histórico-cultural y por el papel que desempeñan en la estructura y función de los ecosistemas áridos del país (Toledo, 1988); tiene gran diversidad genética, la cual se manifiesta con variación en el porte de la planta, tamaño, forma, espesor y color de las hojas, tamaño y forma de la inflorescencia (Borys *et al.*, 2005).

México es considerado el segundo centro de diversidad, con representación de aproximadamente 300 (89.8 %) especies endémicas (t' Hart, 1997), siendo este el porcentaje de endemismo más alto dentro de las familias y géneros en este país (Thiede, 1995). México es un importante lugar de origen de gran diversidad de especies vegetales (Colinas, 2003).

Debido a su forma inigualable y la belleza de sus flores, las *Crassulaceae* son cotizadas y valoradas en el mercado internacional; lo anterior ha provocado una intensa recolecta y saqueo de plantas, frutos y semillas de manera ilegal, con fines de venta y registro en otros países (Bravo-Hollis, 1978). La conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad; las diferentes especies vegetales han estado sometidas a una activa interacción con el ambiente, lo cual ha generado un gran número de genotipos adaptados a diferentes condiciones locales, ampliando la diversidad genética (Becerra & Paredes, 2000).

En el estado de Morelos están presentes el 70.5 % de las familias de plantas vasculares de México, el 36.4 % de los

In the state of Morelos, 70.5 % of the families of vascular plants of Mexico are present, 36.4 % of the genera and 14.2 % of the species. These numbers reveal that the state is an important reservoir of diversity for all vegetal groups and at distinct levels of taxonomical hierarchy (Rendón & Fernández, 2007).

Morphological characteristics have been being used to study genetic diversity, identify cultivated plants and conserve genetic resources (Yasmin *et al.*, 2006), as well as the method of molecular characterization measuring genetic variability directly at the scale of the DNA molecule (Watson & Eyzaguirre, 2002). Molecular markers have become important tools in studies on genetic diversity, as RAPDs (Bered *et al.*, 2005 and Yasmin *et al.*, 2006).

Associations of genetic markers by means of cluster analysis are considered to be very useful since they include a high number of characters and because it is a hierarchical classification that can be used to determine threshold levels of similarity among species (Singh, 1999). As well, they indicate the formation of very distinct clusters to those considered from the classical approach based on the morphological and anatomical analysis (García, 2003).

The description and characterization of *Crassulaceae* by Eggli (2003) and Acevedo-Rosas *et al.* (2004) were based on morphological traits. Van Ham *et al.* (1994) used universal primers to amplify DNA by PCR of three non-coding regions of chloroplastic DNA with the purpose of studying the variation in length of the DNA sequence in *Crassulaceae* and related species. Similarly, Van Ham & t' Hart (1998), analyzed a restriction zone of chloroplastic DNA of 44 species of six *Crassulaceae* subfamilies, using 12 restriction endonucleases in order to establish phylogenetic relations among them.

Morphological and molecular analysis in *Crassulaceae* is of high importance to know the genetic diversity and the relation among genotypes, since this will allow a correct classification, genotype conservation and genetic resources utilization. Currently, there is a high number of collections of germplasm with genotypes of high agronomical value which could be used as progenitors in breeding programs; however, in many occasions their degree of diversity and the relation among materials are unknown, making their utilization difficult. Genetic resources in Mexico have not been properly exploited due to limited available data on

géneros y el 14.2 % de las especies. Estas cifras revelan que el estado es un reservorio importante de diversidad de todos los grupos vegetales y a distintos niveles de jerarquía taxonómica (Rendón & Fernández, 2007).

Las características morfológicas se han venido utilizando para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas, conservar los recursos genéticos (Yasmin *et al.*, 2006), así como también el método de la caracterización molecular que mide la variabilidad genética directamente a nivel de la molécula de DNA (Watson & Eyzaguirre, 2002). Los marcadores moleculares se han convertido en herramientas importantes en estudios de diversidad genética, como los RAPDs (Bered *et al.*, 2005 y Yasmin *et al.*, 2006).

Las asociaciones de marcadores genéticos por medio del análisis de agrupamiento se consideran muy útiles ya que incluyen un gran número de caracteres y porque es una clasificación jerárquica que puede ser usada para determinar los niveles umbrales de similitud entre especies (Singh, 1999). También, indican la formación de agrupaciones muy distintas a las consideradas a partir del planteamiento clásico basado en el análisis morfológico y anatómico (García, 2003).

Eggli (2003) y Acevedo-Rosas *et al.* (2004) se basaron en caracteres morfológicos para describir y caracterizar a las *Crassulaceae*. Van Ham *et al.* (1994) usaron iniciadores universales para hacer amplificación de DNA mediante PCR de tres regiones no codificantes del DNA del cloroplasto con el propósito de estudiar la variación en la longitud de la secuencia de DNA en las crasuláceas y especies relacionadas. De igual manera, Van Ham & t' Hart (1998), analizaron una zona de restricción del DNA del cloroplasto de 44 especies de seis subfamilias *Crassulaceae* utilizando 12 endonucleasas de restricción a fin de establecer las relaciones filogenéticas entre ellas.

El análisis morfológico y molecular en las *Crassulaceae* es de gran importancia para conocer la diversidad genética y la relación entre genotipos, ya que esto permitirá una clasificación correcta, la conservación de genotipos y la utilización de recursos genéticos. Actualmente existe un gran número de colecciones de germoplasma con genotipos de un alto valor agronómico que podrían ser usados como progenitores en los programas de mejoramiento genético; sin embargo, en muchas ocasiones se desconoce su grado de diversidad y la relación existente entre materiales, lo que dificulta su utilización. Los recursos genéticos en México,

the characteristics and genetic diversity of many species. (Becerra & Paredes, 2000).

Based on the aforementioned, the objective of the research work was to evaluate genetic diversity and relations by performing the morphological and molecular characterization by RAPDs of twelve species of the *Crassulaceae* family. This characterization will allow to generate complementary information for plant breeders, and for a future utilization of genetic material to perform interspecific crosses.

Material and Methods

Studied genetic material were twelve species of the *Crassulaceae* family cultivated in pot: *Echeveria runyonii* topsy-turvy (Haworthia x *E. Shaviana*) (Mexico) (Maatz, 2012), *E. perle* von Nuremberg (*E. gibbiflora* var. *metalica* x *E. potosina*) (Mexico and San Luis Potosi), *E. agavoides* Lem. (San Luis Potosi), *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther* (Mexico), *Echeveria elegans* Rose (Mexico), *E. pulvinata* (Puebla), *E. derembergii* (Mexico) *E. setosa* Rose & J.A. Purpus (Puebla), *Pachyphytum oviferum* J.A. Purpus (San Luis Potosi), *Sedum clavatum* (Mexico), *S. nussbaumerianum* Bitter (Mexico), *S. palmeri* S. Watson (Mexico) (Sajeve & Constanzo, 1997) (Figure 1).

Materials were obtained from commercial nurseries, they were selected by size, height, color and shape of the leaves, since these species stand out for their decorative value, as well as for the capacity they have to produce shoots, in addition of being some of the most commercialized species. Thirty plants were assessed for morphological analysis, of each indicated species.

Morphological characterization

Assessment of 30 plants was performed when flowering. Units of measurements in cm were measured with a thirty-centimeter ruler and a digital Vernier to obtain mm; and the color of organs was assessed with a color chart (RHS color chart®). Flowers were observed under microscopy to evaluate the number of stamens and carpels (Table 1). Some characteristics pointed out by Martínez-Ávalos & Mora-Olivo (2000), García-Ruiz & Pérez-Calix (2007) employed for the description of some species of the *Crassulaceae* family were used.

no se han aprovechado adecuadamente debido a la limitada información disponible sobre las características y la diversidad genética de muchas especies (Becerra & Paredes, 2000).

Con base en lo anterior, el objetivo de la investigación fue evaluar la diversidad y relaciones genéticas realizando la caracterización morfológica y molecular mediante RAPDs de doce especies de la familia *Crassulaceae*. Esta caracterización permitirá generar información complementaria para los fitomejoradores, y para una futura utilización del material genético para realizar cruizas interespecíficas.

Materiales y Métodos

El material genético estudiado fueron doce especies de la familia *Crassulaceae* cultivadas en maceta, *Echeveria runyonii* topsy-turvy (Haworthia x *E. Shaviana*) (México) (Maatz, 2012), *E. perle* von Nuremberg (*E. gibbiflora* var. *metalica* x *E. potosina*) (México y San Luis potosi), *E. agavoides* Lem. (San Luis Potosi), *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther* (México), *Echeveria elegans* Rose (México), *E. pulvinata* (Puebla), *E. derembergii* (México) *E. setosa* Rose & J.A. Purpus (Puebla), *Pachyphytum oviferum* J.A. Purpus (San Luis Potosi), *Sedum clavatum* (México), *S. nussbaumerianum* Bitter (México), *S. palmeri* S. Watson (México) (Sajeve & Constanzo, 1997) (Figura 1).

Las plantas se obtuvieron de viveros comerciales, fueron seleccionadas por su porte, color y forma de las hojas, ya que son especies que se distinguen por su valor decorativo, así como por la capacidad que tienen de producir hijuelos, además, de ser algunas de las especies que más se comercializan. Se evaluaron 30 plantas para el análisis morfológico, de cada una de las especies señaladas.

Caracterización morfológica

La evaluación se realizó al momento de la floración de las 30 plantas. Las unidades de medición en cm se midieron con regla de 30 cm y con vernier digital para obtener mm; y el color de los órganos se evaluó con una carta de colores (RHS color chart®). Las flores se observaron al microscopio para evaluar el número de estambres y carpelos (Tabla 1). Se usaron algunas características señaladas por Martínez-Ávalos & Mora-Olivo (2000), García-Ruiz & Pérez-Calix (2007) utilizados para la descripción de algunas especies de la familia *Crassulaceae*.



Figure 1. Studied species of the Crassulaceae family. a: *Echeveria runyonii* topsy-turvy, b: *E. perle* von nuremberg, c: *E. agavoides* Lem., d: *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther.*, e: *E. elegans* Rose, f: *E. pulvinata*, g: *E. derembergii*, h: *E. setosa* Rose & J.A. Purpus, i: *Pachyphytum oviferum* J.A. Purpus, j: *Sedum clavatum*, k: *S. nussbaumerianum* Bitter, l: *S. palmeri* S. Watson.

Figura 1. Especies de la familia Crassulaceae estudiadas. a: *Echeveria runyonii* topsy-turvy, b: *E. perle* von nuremberg, c: *E. agavoides* Lem., d: *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther.*, e: *E. elegans* Rose, f: *E. pulvinata*, g: *E. derembergii*, h: *E. setosa* Rose & J.A. Purpus, i: *Pachyphytum oviferum* J.A. Purpus, j: *Sedum clavatum*, k: *S. nussbaumerianum* Bitter, l: *S. palmeri* S. Watson.

Molecular characterization

DNA was obtained from one plant per species. Four hundred mg of foliar tissue of each one of the twelve species were weighted, to extract DNA according to the methodology reported by Andrade *et al.* (2004); at the last step, the obtained DNA was dissolved into 25 μL of 0.1 TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) con 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of RNase, heating at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 40 min. and stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ until analysis.

DNA integrity in all plants was assessed by means of electrophoresis in 1 % agarose gel (ultrapure GIBCO[®]), gel was dyed with ethidium bromide (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In gel wells, a 9 μL volume was loaded, constituted by 1 μL of DNA sample, 7 μL of distilled deionized autoclaved

Caracterización molecular

Se utilizó una planta por especie para obtener el DNA. Se pesaron 400 mg de tejido foliar de cada una de las doce especies, para extraer el DNA de acuerdo a la metodología reportada por Andrade-Rodríguez *et al.* (2004); en el último paso, el DNA obtenido se disolvió en 25 μL de 0.1 TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) con 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de RNase, calentado a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 40 min. y almacenado a -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

La integridad del DNA de todas las plantas se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa (ultrapura GIBCO[®]) al 1 %, el gel se tiñó con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). En los pozos del gel se cargaron 10 μL constituidos por 1 μL de muestra de DNA, 7 μL de agua

Table 1.
Qualitative and quantitative morphological traits assessed
in twelve species of the Crassulaceae family.

Tabla 1.
Caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos
evaluados en doce especies de la familia Crassulaceae.

Traits	Quantitative	Qualitative
Form of the plant	Height (cm) and Diameter (mm)	Rosette and Branch
Stem	Number of sheets	Phylotaxy
Leaves	Length (cm) and width (cm), thickness at the base and middle part (mm)	Apex shape, Petiole or pseudopetiole, Color
Inflorescence	Number per plant, length (cm), flowers per inflorescence, peduncle length (cm), peduncle diameter (mm).	Origin: basal, middle, apical, ramifications: primary, secondary. Type of inflorescence.
Bracts	Number, length (mm), width (mm), base thickness and middle part (mm).	Phylotaxy, bract shape, apex shape and base shape
Flower	Length (mm), basal diameter (mm) and pedicel length (mm).	
Chalice		Form, Free or merged
Separations	Number of sepals, length (mm) and width (mm).	
Corolla	Diameter (mm)	Shape
Petals	Number	Color
Stamens	Number	
Carpels	Number, and length of carpels (mm)	Free or merged
Time of flowering		Date

water and 1 μL of loading buffer (40 % glycerol, 0.1 % bromophenol blue, TE pH 8.0). Electrophoresis was realized under room temperature with TAE buffer (0.04M Tris-base, glacial acetic acid, 1 mM EDTA) for two hours, time in which the reference band migrated 7.0 cm approximately. After this time, DNA samples were visualized and photo-documented in a gel analyzer (Syngene® GVM20).

DNA concentration and purity were quantified from the obtained DNA solution, for each sample a 1:150 dilution was prepared [5 μL of sample DNA more 995 μL of TE 10x (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)], to quantify DNA concentration and purity by means of a spectrophotometer Genesys 6® of ultra-violet light. Concentration was assessed according to the formula:

$$[\text{DNA (ng } \mu\text{L}^{-1})] = (\text{OD}^{260})(\text{DF})(50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1})$$

destilada deionizada autoclaveada y 1 μL de buffer de carga (40 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol, TE pH 8.0). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente con buffer TAE (0.04 M Tris-base, ácido acético glacial, 1 mM EDTA) durante dos horas, tiempo en que la banda de referencia migró 7.0 cm aproximadamente. Transcurrido este tiempo, las muestras de DNA se visualizaron y se foto documentaron en un analizador de geles (Syngene® GVM20).

La concentración del DNA y su pureza fueron cuantificadas a partir de la solución de DNA obtenida, para cada muestra se preparó una dilución de 1:150 [5 μL de DNA de la muestra más 995 μL de TE 10x (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)], para cuantificar la concentración y pureza del DNA por medio de un espectrofotómetro Genesys 6® de luz ultravioleta. La concentración se estimó mediante la fórmula:

$$[\text{DNA (ng } \mu\text{L}^{-1})] = (\text{OD}^{260})(\text{DF})(50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1})$$

Where:

OD_{260} = Optical density of DNA solution read at 260 nm wavelength.

DF = Dilution factor.

$50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ = DNA concentration determined for a value of 1.0 a 260 nm.

Purity was assessed as the proportion of readings at wavelengths of 260 and 280 nm (260/280). Values between 1.8 and 2.0 of optical density (OD) indicate a high degree of purity. Values lower than 1.8 indicate contamination of the DNA sample with proteins and/or other elements absorbing ultraviolet light; while higher values indicate contamination by chloroform, phenol or other organic substance. Once readings for each DNA sample were obtained, working solution at $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ were prepared.

RAPDs analysis

DNA Amplification (TECHNE TC-412®) was performed with 68 primers (Operon Technologies Inc.) of randomized sequence of ten nucleotides from the OPA, OPB, OPC kit, plus eight indicators: SAP, out of these, 20 primers were selected (Table 2), based on quantity and brightness of amplified RAPDs fragments, which were used to perform the study of genetic similarity.

Reaction mix consisted of $10 \mu\text{L}$ of dNTPs ($5 \mu\text{M}$ of each dNTP, GIBCO BRL), $2.5 \mu\text{L}$ of PCR buffer (10x), $1.5 \mu\text{L}$ MgCl_2 (3 mM), $2.0 \mu\text{L}$ of initiator ($10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$), $0.3 \mu\text{L}$ (1.5 U) of native DNA taq polymerase (Invitrogen), $4 \mu\text{L}$ of DNA ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), adjusting to $25 \mu\text{L}$ with $4.7 \mu\text{L}$ of deionized sterilized water.

The program used for amplification by means of polymerase chain reaction (PCR) consisted in an initial cycle of DNA pre-denaturalization at $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 minutes and 35 cycles integrated by the following steps: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min to separate DNA strands, $36 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min for primer alignment, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 min for extension or polymerization and a cycle of final extension at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min.

The separation of amplified fragments was made by means of electrophoresis in 1.5 % (p/v) agarose gel (Invitrogen) with ethidium bromide ($10 \mu\text{g } \text{L}^{-1}$). The electrophoresis was performed at 75 V for 4 h. Gels with amplified DNA fragments were photo-documented in an Electrophoresis Documentation and Analysis System (Syngene GVM20®, Kodak®).

Donde:

OD_{260} = Densidad óptica de la solución de DNA leída a la longitud de onda de 260 nm.

DF = Factor de dilución.

$50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ = Concentración de DNA determinada para un valor de 1.0 a 260 nm.

La pureza se evaluó como la proporción de las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (260/280). Los valores entre 1.8 y 2.0 de densidad óptica (OD) indican alto grado de pureza. Valores menores a 1.8 indican contaminación de la muestra de DNA con proteínas y/u otros elementos absorbentes de luz UV; mientras que valores mayores indican contaminación por cloroformo, fenol u otra sustancia orgánica. Una vez obtenida la lectura para cada muestra de DNA se prepararon las soluciones de trabajo a $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Análisis RAPDs

Se realizó amplificación (TECHNE TC-412®) de DNA con 68 iniciadores (Operon Technologies Inc.) de secuencia aleatoria de diez nucleótidos del kit OPA, OPB, OPC, más ocho iniciadores: SAP, de estos, se eligieron 20 iniciadores (Tabla 2) con base en la cantidad y brillo de los fragmentos RAPDs amplificados, mismos que fueron utilizados para efectuar el estudio de similitud genética.

La mezcla de reacción consistió de $10 \mu\text{L}$ de dNTPs ($5 \mu\text{M}$ de cada dNTP, GIBCO BRL), $2.5 \mu\text{L}$ de amortiguador PCR (10x), $1.5 \mu\text{L}$ MgCl_2 (3 mM), $2.0 \mu\text{L}$ iniciador ($10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$), $0.3 \mu\text{L}$ (1.5 U) de taq DNA polimerasa nativa (Invitrogen), $4 \mu\text{L}$ DNA ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) ajustando a $25 \mu\text{L}$ con $4.7 \mu\text{L}$ agua desionizada esterilizada.

El programa que se usó para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en un ciclo inicial de predesnaturalización de DNA a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 min y 35 ciclos integrados por las etapas siguientes: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min para separar bandas de DNA, $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min. para alineación de iniciador, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min. para extensión o polimerización y un ciclo de extensión final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min.

La separación de fragmentos amplificados se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) 1.5 % (p/v) con bromuro de etidio ($10 \mu\text{g } \text{L}^{-1}$). La electroforesis se realizó a 75 V por 4 h. Los geles con los fragmentos de DNA amplificados se foto documentaron en un Sistema de Documentación y Análisis de Electroforesis (Syngene GVM20®, Kodak®).

Table 2.
Sequence of the twenty primers selected for the molecular characterization of twelve species of the *Crassulaceae* family.

Tabla 2.
Secuencia de los veinte iniciadores seleccionados para la caracterización molecular de doce especies de la familia *Crassulaceae*.

Primers	Key	Sequence of bases
2	OPA02	5' TGC CGA GCT G 3'
4	OPA04	5' AAT CGG GCT G 3'
7	OPA07	5' GAA ACG GGT G 3'
8	OPA08	5' GTG ACG TAG G 3'
9	OPA09	5' GGG TAA CGC C 3'
10	OPA10	5' GTG ATC GCA G 3'
1	OPB-01	5' GTT TCG CTC C 3'
6	OPB-06	5' TGC TCT GCC C 3'
7	OPB-07	5' GGT GAC GCA G 3'
8	OPB-08	5' GTC CAC ACG G 3'
10	OPB-10	5' CTG CTG GGA C 3'
12	OPB-12	5' CCT TGA CGC A 3'
18	OPB-18	5' CCA CAG CAG T 3'
19	OPB-19	5' ACC CCC GAA G 3'
8	OPC08	5' TGG ACC GGT G 3'
9	OPC09	5' CTC ACC GTC C 3'
13	OPC13	5' AAG CCT CGT C 3'
16	OPC16	5' CAC ACT CCA G 3'
25	SAP-03	5' TGG GAC CTC C 3'
26	SAP-04	5' GGA GCT ACC T 3'

Statistical analysis

The size of DNA fragments produced by RAPDs primers was obtained using Gene tools Labworks 4.0® software. The presence of RAPDs markers was determined by means of the analysis of the electrophoretic profiles generated for each one of the *Crassulaceae* species. For dendrogram construction, data were analyzed, based on the presence (indicated by 1) or the absence (indicated by 0) of amplified fragments with the selected decamer primers.

Análisis estadístico

El tamaño de los fragmentos de DNA producidos por los iniciadores RAPDs se obtuvo utilizando el programa Gene tools Labworks 4.0®. La presencia de marcadores RAPDs se determinó mediante el análisis de los perfiles electroforéticos generados por cada una de las especies de *Crassulaceae*. Para la construcción del dendrograma, los datos se analizaron con base en la presencia (indicada por 1) o la ausencia (indicada por 0) de fragmentos amplificados con los iniciadores decámeros seleccionados.

Morphological and molecular data were processed using the Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System (NTSYSpc 2.1). Distance coefficient used for clustering was the Euclidian distance. Cluster analyses were realized on the relation of matrixes with Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean method (UPGMA) (Avisé, 1994). NTSYS software proposes cut-off point in the dendrogram according to a congruence assessment comparing with a tridimensional graph of projection to observe the number of formed groups.

Results and Discussion

Morphological characterization

Qualitative characters allowed to observe two types of characteristics in the studied species, the first one are the discriminative characteristics with which each one of the species are characterized and make them distinctive, expressing *Crassulaceae* morphological diversity; growth habit, shape and color of the leaf, origin and type of inflorescence, shape of bracts, and color are included in these characteristics; the second type of characteristics are those of similarity shared among these species, like apex and base shape, inflorescence ramification, phylotaxy of bracts, calyx shape, corolla and petals shape, carpels and flowering time, since they are qualitative characters, a multivariate analysis was not run.

The four first main components explained 81 % of the observed morphological variability. Principal component 1 (PC1) with an eigenvalue of 9.795 explained 40.81 % of the variation, where the variables that most contributed were leaf length, thickness of the base of the leaf, thickness in the medium part of the leaf, diameter of the peduncle, bract length, flower length, basal diameter, sepal length, corolla width and carpel length. Principal component 2 (PC2) explained 21.07 % and the variables that described this variation within this component are inflorescence length, peduncle length, bract width, thickness of the base of the bract, thickness of the medium part of the bract. In principal component 3 (PC3), height, number of leaves and number of flowers per ramification variables are those that explained 13.37 % of the total variability. In principal component 4 (PC4), length of the pedicel variable explained 6.13 % of the variance (Table 3).

López-Gutiérrez *et al.*, (2015) realized morphological comparison between wild and cultured populations of

Los datos morfológicos y moleculares se procesaron utilizando el Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYSpc 2.1). El coeficiente de distancia empleado para el agrupamiento fue la distancia Euclidiana. Los análisis de agrupamiento se realizaron sobre la relación de matrices con el método de ligamiento promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (siglas en inglés, UPGMA) (Avisé, 1994). El programa NTSYS propone el punto de corte en el dendrograma de acuerdo con una evaluación de congruencia comparándolo con una gráfica tridimensional de proyección para observar el número de grupos formados.

Resultados y Discusión

Caracterización morfológica

Los caracteres cualitativos permitieron observar dos tipos de características en las especies estudiadas, el primero son las características discriminativas con las cuales se caracteriza a cada una de las especies y las hace distintivas, lo cual manifiesta la diversidad morfológica de las *Crassulaceae*; en estas características se incluye hábito de crecimiento, forma de la hoja, color de la hoja, origen de la inflorescencia, tipo de inflorescencia, forma de las brácteas y color; el segundo tipo de características son las de similitud que comparten entre estas especies, como forma del ápice, forma de la base, ramificación de la inflorescencia, filotaxia de las brácteas, forma del cáliz, forma de la corola y pétalos, cárpelos y época de floración, debido a que son caracteres cualitativos no se corrió un análisis multivariado.

Los cuatro primeros componentes principales explicaron el 81 % de la variabilidad morfológica observada. El componente principal 1 (PC1) con un valor propio de 9.795 explicó el 40.81 % de variación, donde las variables de mayor contribución fueron largo de hoja, grosor en la base de la hoja, grosor en la parte media de la hoja, diámetro del pedúnculo, longitud de bráctea, longitud de flor, diámetro basal, longitud de sépalos, ancho de la corola y longitud de carpelos. El componente principal 2 (PC2), explica 21.07 % y las variables que describen esta variación dentro de este componente son longitud de inflorescencia, longitud del pedúnculo, ancho de la bráctea, grosor de la base de la bráctea, grosor de la parte media de la bráctea. En el componente principal 3 (PC3), las variables altura, número de hojas y número de flores por ramificación son las que explican 13.37 % de la variabilidad total. El componente principal 4 (PC4) la variable longitud del pedicelo explica el 6.13 % de la varianza (Tabla 3).

Table 3.
Proportion of global variance, vectors and eigenvalues of the principal components analysis (PC) of the 24 morphological traits describing variation in 12 Crassulaceae species.

Tabla 3.
Proporción de la varianza global, vectores y valores propios del análisis de componentes principales (PC) de los 24 caracteres morfológicos que describen la variación en 12 especies de Crassulaceae.

Trait	PC1	PC2	PC3	PC4
Height	0.481	0.289	0.699	0.216
Diameter	-0.659	-0.463	-0.304	-0.286
Number of sheets	-0.180	-0.325	-0.728	0.255
Leaf length	-0.679	-0.528	0.062	-0.263
Sheet width	-0.613	-0.563	0.208	-0.358
Thickness at the base of the leaf	-0.848	-0.404	0.141	0.022
Thickness in the middle part of the leaf	-0.844	-0.116	0.004	0.189
Number of inflorescences	0.068	-0.372	-0.337	-0.167
Inflorescence length	-0.506	-0.819	-0.054	0.112
Number of flowers per branch	-0.336	-0.411	0.768	-0.179
Pedicle length	-0.396	-0.780	0.058	0.255
Pedicle diameter	-0.771	0.351	-0.131	-0.200
Number of bract	-0.379	-0.566	0.634	-0.172
Bract length	-0.836	0.126	0.261	0.295
Bract width	-0.655	0.594	0.326	-0.221
Thickness of the base of the bract	-0.523	0.666	0.341	-0.084
Thickness of the middle part of the bract	-0.593	0.662	0.227	0.034
Flower length	-0.863	0.036	-0.089	0.400
Basal diameter	-0.834	0.220	-0.383	-0.017
Pedicle length	-0.485	-0.125	0.249	0.719
Sepals length	-0.744	0.450	-0.238	-0.041
Sepals width	-0.636	0.390	-0.386	-0.074
Corolla width	-0.847	0.276	-0.291	-0.092
Carpels length	-0.679	0.325	0.236	-0.038
Own values	9.795	5.058	3.210	1.471
Explained variance (%)	40.814	21.077	13.378	6.132
Accumulated variance (%)	40.814	61.891	75.269	81.401

Opuntia atropes (Cactaceae) in Michoacán, Mexico; assessed morphological variables managed separating cultured and not cultured individuals by principal component.

In another research study realized by Martínez-Moreno *et al.*, (2006), the three principal components were reported to show 84.16 % of the total variability existing in the individuals, which is obtained by measuring 18 variables. In another research study realized by Morales *et al.*, (2016),

López-Gutiérrez *et al.*, (2015) realizaron la comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México; las variables morfológicas evaluadas permitieron que los componentes principales separaran a los individuos cultivados de los no cultivados.

En otra investigación realizada por Martínez-Moreno *et al.*, (2006) reportan que los tres componentes principales

the first two PC were reported to explain 91 % of the variance with nine variables. Both research studies are congruent with the percentage we reported with 81 % of cumulated variance with 24 assessed morphological variables.

Quantitative characters separated the twelve species into five groups according to the cluster analysis, with an average taxonomical distance coefficient of 0.28. In the first group seven species were located: *E. runyonii*, *P. oviferum*, *E. elegans*, *E. perle*, *E. pumila*, *E. pulvinata*, and *E. agavoides*, being the group where the highest number of species was gathered. General characteristics shared by the species from the first group are leaves in rosette, sagittal-elliptical shape of their leaves, and above all a distinct characteristic among them is the clusters of bunches of inflorescence and with a disposition of uniparous scorpioid cyme. The second group was integrated by *E. derembergii* and *E. setosa*, these species are similar in the shape of the rosette; however, *E. setosa* present trichomes in the leaves. The third group corresponds to *S. clavatum*, separated from *Echeverias* and *Pachyphytum*, which, although presenting similarity with them for sharing the morphology of leaves in rosette and shape of the flower, was distinguished by its small flowers (Figure 2).

muestran el 84.16 % de la variabilidad total existente en los individuos, misma que se obtiene con la medición de las 18 variables. En otra investigación realizada por Morales *et al.*, (2016) reportan que los primeros dos PC explicaron el 91 % de la varianza con nueve variables. Ambas investigaciones son congruentes al porcentaje reportado en este estudio, con el 81 % de varianza acumulada con 24 variables morfológicas evaluadas.

Los caracteres cuantitativos separaron a las doce especies en cinco grupos según el análisis de conglomerados, con un coeficiente de distancia taxonómica media de 0.28. En el primer grupo se ubicaron siete especies: *E. runyonii*, *P. oviferum*, *E. elegans*, *E. perle*, *E. pumila*, *E. pulvinata*, y *E. agavoides*, siendo donde se agruparon mayor número de especies. Las características generales compartidas por las especies del primer grupo son las hojas arrosetadas, la forma sagitada-elíptica de sus hojas, y sobre todo una característica distintiva entre ellas es la inflorescencia racimo de racimos y con disposición de cima unípara escorpoidea. El segundo grupo se integró por *E. derembergii* y *E. setosa*, estas especies son similares en la forma de la roseta; sin embargo, *E. setosa* presenta tricomas en las hojas. El

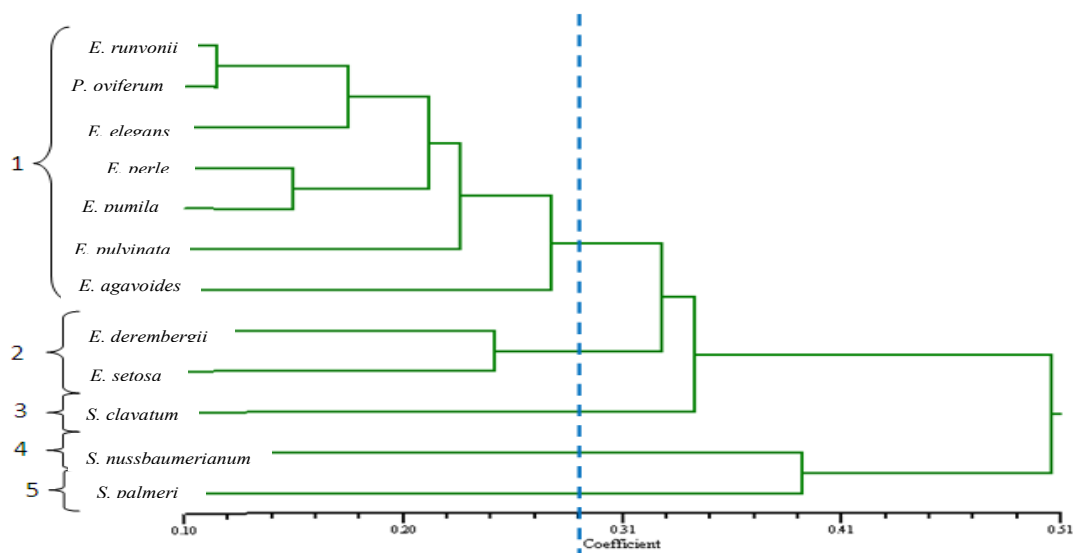


Figure 2. Fenogram of twelve species of the family *Crassulaceae*, constructed by the UPGMA method (average linkage) from 35 quantitative characters of the plant. The distance coefficient refers to the Average Taxonomic Distance.

Figura 2. Fenograma de doce especies de la familia *Crassulaceae*, construido por el método de UPGMA (ligamiento promedio) a partir de 35 caracteres cuantitativos de la planta. El coeficiente de distancia se refiere a la Distancia Taxonómica Media. Línea punteada: referencia para formación de grupos.

The fourth group was formed by *S. nussbaumerianum*, this species clusters with *S. palmeri* (from the fifth group), at a taxonomic distance of 0.39; these are similar in growth habit, and inflorescence; these two species of *Sedum* are in turn bound with other ten species of *Crassulaceae* with an average taxonomical distance coefficient of 0.51, being these ones the farthest from the other species of *Crassulaceae* of the dendrogram (Figure 2).

As observed, *P. oviferum* clustered with six species of *Echeveria*, due to the fact that they share similar characteristic related to the shape of the leaves, color, size and inflorescence, but it should be said that its growth is not in rosette, but presents an ascendant ramification.

The most similar species according to the average taxonomical distance coefficient were *E. runyonii* with *P. oviferum*, in contrast, the most distinct species were *S. nussbaumerianum* and *S. palmeri*, which have an average taxonomical distance coefficient of 0.39 among them.

According to the results, it can be said that *Crassulaceae* is a very complex family, due to its easy hybridization and there could have crossbreeding not only among species of the same genus but among different genera as well, being the possible cause for which morphological similarity is shared among genera (Jones *et al.*, 2010; Jimeno-Sevilla *et al.*, 2013; Jimeno-Sevilla *et al.*, 2014 and Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015). The current specific taxonomical classification might also be incorrect. In phylogenetic analysis of *Crassulaceae*, cladograms riddled with polytomies lacking of resolution has been found repeatedly (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004).

Molecular characterization

Twenty primers were selected for the molecular analysis, to present the highest number of amplified products, the brightest and the most defined bands. Primers generated fragments that varied from 231 to 4,774 pb.

Selected primers for the twelve species of the *Crassulaceae* family produced 594 RAPDs fragments, 99 % of them were polymorphic and allow to differentiate the twelve species with 76 markers. OPA-09, OPB-18 and SAP-03 primers did not generate markers fragments (Table 4).

Primers that generated the highest number of markers were OPB-10 and OPB-19, allowing to characterize the highest number of species. Primers that showed three markers

tercer grupo correspondió a *S. clavatum*, separandose de las *Echeverias* y *Pachyphytum*, que aunque tiene similitud con ellas por compartir la morfología de hojas arrosadas forma de la flor, se distinguió por sus flores pequeñas (Figura 2).

El cuarto grupo se conformó por *S. nussbaumerianum*, esta especie se agrupa con *S. palmeri* (del quinto grupo), a una distancia taxonómica de 0.39; éstas son similares en hábito de crecimiento e inflorescencias; estas dos especies de *Sedum* a su vez se unen con las otras diez especies de crasuláceas con un coeficiente de distancia taxonómica media de 0.51 siendo estas las más lejanas de las otras especies de crasuláceas del dendrograma (Figura 2).

Como se observa, *P. oviferum* se agrupó con seis especies de *Echeveria*, esto fue debido a que comparten características similares en cuanto a forma de las hojas, color, tamaño e inflorescencia, pero cabe mencionar que su crecimiento no es en roseta, sino que presenta ramificación ascendente.

Las especies más similares de acuerdo con el coeficiente de distancia taxonómica media fueron *E. runyonii* con *P. oviferum*, en contraste, las especies más distintas al resto fueron *S. nussbaumerianum* y *S. palmeri*, que entre sí tienen un coeficiente de distancia taxonómica media de 0.39.

Conforme a los resultados, se puede decir que las *Crassulaceae* son una familia muy compleja, debido a que es fácil su hibridación y puede haber cruzamientos no solo entre especies del mismo género sino de diferentes géneros, siendo la posible causa de que compartan similitud morfológica entre géneros (Jones *et al.*, 2010, Jimeno-Sevilla *et al.*, 2013, Jimeno-Sevilla *et al.*, 2014 y Rodríguez-Rojas *et al.*, 2015). También es probable que la clasificación taxonómica específica actual no sea la correcta. En los análisis filogenéticos de *Crassulaceae* repetidamente se han encontrado cladogramas plagados de politomías carentes de resolución (Acevedo-Rosas *et al.*, 2004).

Caracterización molecular

Se seleccionaron 20 iniciadores para el análisis molecular, por presentar el mayor número de productos amplificados, bandas más brillantes y mejor definidas. Los iniciadores generaron fragmentos que variaron de 231 a 4,774 pb.

Los iniciadores seleccionados para las doce especies de la familia *Crassulaceae* produjeron 594 fragmentos RAPDs,

were OPA-02, OPA-07, OPA-10, OPB-07, OPB-08, OPB-12 and OPC-08, those markers were presented in at least two species; OPC-13 and OPC-09 produced only one marker fragment each one and were useful to characterize one plant. No primer for itself allows to characterize all species. *E. agavoides* and *E. pulvinata* were those showing the highest presence of markers (Table 4).

Total and polymorphic RAPDs fragments obtained in the characterization of the twelve species of the *Crassulaceae* family, were higher than those obtained by Montalvo *et al.* (2010) who obtained a total of 97 bands, of which 62.8 % were polymorphic and on the other hand, in the present study, 594 bands were obtained, 99 % of

el 99 % de los cuales fueron polimórficos y permitieron diferenciar a las doce especies con 76 marcadores. Los iniciadores OPA-09, OPB-18, y SAP-03 no generaron fragmentos marcadores (Tabla 4).

Los iniciadores que generaron mayor número de marcadores fueron el OPB-10 y el OPB-19, estos permitieron caracterizar mayor número de especies. Los iniciadores que mostraron tres marcadores fueron OPA-02, OPA-07, OPA-10, OPB-07, OPB-08, OPB-12, OPC-08, estos marcadores se presentaron en al menos dos especies; el OPC-13 y OPC-09 produjeron solo un fragmento marcador cada uno, y fueron útiles para caracterizar a una planta. Ningún iniciador por sí solo permitió caracterizar a todas

Table 4.
Initiators used to study twelve species of the *Crassulaceae* family.

Tabla 4.
Iniciadores usados para estudiar doce especies de la familia *Crassulaceae*.

Primers	Amplified fragments	Polymorphism (%)	Markers fragments (pb)
OPA02 3'TGCGCCCTTC 5'	28	100	4171,4244, 1050
OPA04 3'AATCGGGCTG 5'	38	100	3478, 3058, 1453, 641,585, 334, 240
OPA07 3'GAAACGGGTG 5'	32	100	3211, 2634, 525
OPA08 3'GTGACGTAGG 5'	32	100	1919, 1259, 1013, 801, 745, 395
OPA09 3' GGGTAACGCC 5'	22	100	0
OPA10 3'GTGATCGCAG 5'	26	100	1858,1732,1618
OPB01 5' GTTTCGCTCC 3'	21	96	3095, 1229, 1066, 308
OPB06 3' TGCTCTGCC 5'	25	96	2528,1956, 2526, 887, 1581, 373
OPB07 3'GGTGACGCAG 5'	45	100	3135, 796, 231
OPB08 5' GTCCACACGG 3'	25	98	734, 694,595
OPB10 3'CTGCTGGGAC 5'	39	100	2723, 2306, 2244,1441, 847, 1344, 267, 1303, 712, 441, 294
OPB12 3' CCTTGACGCA 5'	29	96	3275, 2506, 312
OPB18 3' CCACAGCAGT 5'	24	100	0
OPB19 3' ACCCCCCGAAG 5'	32	100	4774,3172,1604, 4587, 1580, 1469, 636, 625, 395
OPC08 3' TGGACCGGTG 5'	30	100	2968, 1206, 1430
OPC09 3' CTCACCGTCC 5'	28	100	309
OPC13 3' AAGCCTCGTC 5'	24	96	2791
OPC16 3' TTTGCCCGGA 5'	26	100	788,353, 306, 282, 241
SAP03 3' TGGGACCTCC 5'	26	92	0
SAP04 3' GGAGCTACCT 5'	24	100	2935, 2682, 618, 333, 249
Total	594	99	76

which were polymorphic. The cluster analysis obtained by Montalvo *et al.* (2010) allow them to differentiate all genotypes; they could define the presence of a group made by individuals 1, 2 and 3, while genotype 4 was genetically farther. In our study, 6 different groups were separated in which groups did not behave according to their taxonomical classification. It has to be said that the study of Montalvo *et al.* (2010) was made up of 4 seeds of a same species, compared to the study realized, in which species from different genera were compared.

The similarity of the twelve species of the *Crassulaceae* family determined with the 594 fragments varied from 0.576 to 0.692; of the 66 obtained genetic similarities, six were lower than 0.6 and correspond to *E. perle* with *E. pumilla*, *E. agavoides* with *E. elegans*, *E. agavoides* with *P. oviferum*, *E. pumilla* with *E. setosa*, and *E. pumila* with *S. palmeri*; in contrast, the highest genetic similarity was obtained for *E. runyonii* with *E. derembergii* (0.692), *E. setosa* with *S. palmeri* (0.685), *E. perle* with *E. agavoides* (0.668), *E. runyonii* with *E. perle* (0.667), *E. runyonii* with *S. palmeri* (0.663), *E. derembergii* with *P. oviferum* (0.663), *P. oviferum* with *S. nussbaumerianum* (0.660). The highest genetic similarity was expected to be for species of the same genus, but it was not like that, various species of different genera were found within the pairs with the highest similarity, such as *E. setosa* with *S. palmeri* and *P. oviferum* with *S. nussbaumerianum*.

Associations of genetic markers by means of cluster analysis are considered to be very useful since they include a high number of traits and because it is a hierarchical classification which can be used to predict the threshold levels of similarity among species (Singh, 1999).

The obtained cluster analysis showed that, at a level of 0.65 of genetic distance, six clusters were formed: 1) *E. runyonii*, *E. derembergii*, *P. oviferum*, *S. nussbaumerianum*, being this one the cluster including more species; 2) *E. setosa*, *S. palmeri*, 3) *E. elegans*, *E. pulvinata*, 4) *S. clavatum*, 5) *E. perle*, *E. agavoides*, and 6) *E. pumila*, this last group being the most distinct from the rest, since it is the last incorporated to the group with a distance of similarity of 0.61 with the rest of the species (Figure 3).

The most similar species among themselves (with a coefficient of 0.62) were *E. runyonii* with *E. derembergii*,

las especies. *E. agavoides* y *E. pulvinata* fueron las que mostraron mayor presencia de marcadores (Tabla 4).

Los fragmentos RAPDs totales y polimórficos obtenidos en la caracterización de las doce especies de la familia *Crassulaceae*, fueron mayores a los obtenidos por Montalvo *et al.* (2010) quien obtuvo el total de 97 bandas de las cuales el 62.8 % fueron polimórficas y en cambio en la presente investigación se obtuvieron 594 bandas, el 99 % de las cuales fueron polimórficas. El análisis de agrupamiento obtenido por Montalvo *et al.* (2010), les permitió la diferenciación de todos los genotipos, pudieron definir la presencia de un grupo formado por los individuos 1, 2 y 3, mientras que el genotipo 4 estaba más alejado genéticamente, en nuestro estudio se separaron 6 grupos diferentes en donde los grupos no se comportaron de acuerdo a su clasificación taxonómica, cabe mencionar que el estudio de Montalvo *et al.*, (2010) consto de 4 semillas de una misma especie en comparación al estudio realizado donde se compararon especies de diferente género.

La similitud de las doce especies de la familia *Crassulaceae* determinada con los 594 fragmentos varió de 0.576 a 0.692; de las 66 similitudes genéticas obtenidas, seis fueron menores a 0.6 y correspondieron a *E. perle* con *E. pumilla*, *E. agavoides* con *E. elegans*, *E. agavoides* con *P. oviferum*, *E. pumilla* con *E. setosa*, y *E. pumila* con *S. palmeri*; en contraste, la mayor similitud genética se obtuvo para *E. runyonii* con *E. derembergii* (0.692), *E. setosa* con *S. palmeri* (0.685), *E. perle* con *E. agavoides* (0.668), *E. runyonii* con *E. perle* (0.667), *E. runyonii* con *S. palmeri* (0.663), *E. derembergii* con *P. oviferum* (0.663), *P. oviferum* con *S. nussbaumerianum* (0.660). Se esperaba que la mayor similitud genética se tuviera para especies del mismo género, pero no fue así, dentro de los pares con mayor similitud se encuentran varios de diferentes géneros como son *E. setosa* con *S. palmeri* y *P. oviferum* con *S. nussbaumerianum*.

Las asociaciones de marcadores genéticos por medio del análisis de agrupamiento se consideran muy útiles ya que incluyen un gran número de caracteres y porque es una clasificación jerárquica que puede ser usada para decir los niveles umbrales de similitud entre especies (Singh, 1999).

El análisis del conglomerado obtenido, muestra que a un nivel de 0.65 de distancia genética se formaron seis agrupaciones: 1) *E. runyonii*, *E. derembergii*, *P. oviferum*, *S. nussbaumerianum*, siendo esta la agrupación que incluye más especies; 2) *E. setosa*, *S. palmeri*, 3) *E. elegans*, *E.*

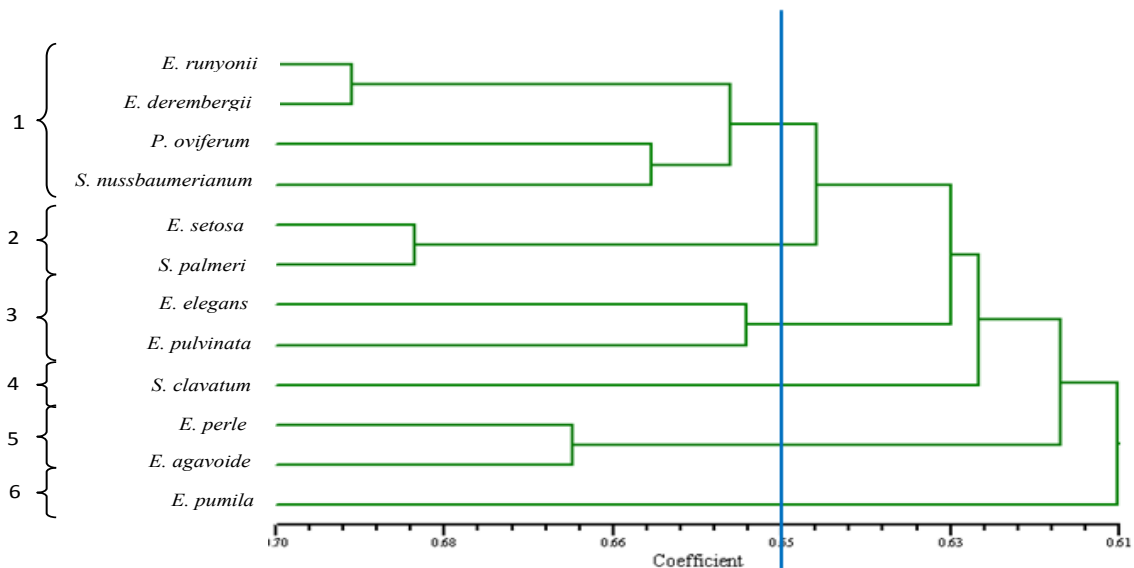


Figure 3. Dendrogram generated from molecular marker data with 12 species of the Crassulaceae family.

Figura 3. Dendrograma generado a partir de datos de marcadores moleculares con de 12 especies de la familia Crassulaceae.

these ones were those that presented the lowest genetic distance. In contrast, the most distinct species to the rest is clearly *E. pumilla*, since it is the one that is incorporated to the group with the highest distance coefficient (0.6) (Figure 3).

The obtained clustering based on morphological traits has three similarities with the clustering generated, based on RAPDs fragments, *E. elegans* was clustered with *E. pulvinata*, as well as *E. perle* with *E. agavoides*, the third similarity was that *Sedum clavatum* was not clustered with any of the eleven species of the study.

Carrillo-Reyes *et al.* (2008) investigated *Thompsonella* and a group of *Echeverias* (*Crassulaceae*) and their phylogenetic relation, based on molecular and morphological traits, in which they realized a dendrogram with the molecular analysis, observing that species of a genus were clustered with those of another genus, similarly to what was obtained in the present research study, in which there is a discrepancy of genetic clustering related to the taxonomical classification, in both research studies, and they concluded that it was necessary to elucidate relations and generic limits of the *Echeveria* group and, moreover, in the Acre clade as a whole.

pulvinata, 4) *S. clavatum*, 5) *E. perle*, *E. agavoides*, y 6) *E. pumilla*, este último grupo es el más distinto al resto, ya que es la última que se incorpora al grupo con una distancia de similitud de 0.61 con las demás especies (Figura 3).

Las especies más similares entre sí (con un coeficiente de 0.62) fueron *E. runyonii* con *E. derembergii*, estas fueron las que menor distancia genética presentaron. En contraste, la especie más distinta al resto es claramente *E. pumilla* ya que es la que se incorpora al grupo con mayor coeficiente de distancia (0.6) (Figura 3).

La agrupación obtenida con base en caracteres morfológicos tuvo tres similitudes con la agrupación generada con base en fragmentos RAPDs, *E. elegans* estuvo agrupada con *E. pulvinata* al igual que *E. perle* con *E. agavoides*, la tercera similitud fue que *Sedum clavatum* no se agrupó con ninguna de las once especies del estudio.

Carrillo-Reyes *et al.* (2008) investigaron a *Thompsonella* y a un grupo de *Echeverias* (*Crassulaceae*), su relación filogenética basada en caracteres moleculares y morfológicos, realizaron un dendrograma con el análisis molecular, observando que se agruparon especies de

Acevedo-Rosas (2004) studied the molecular phylogeny of *Graptopetalum* (*Crassulaceae*) and concluded by saying that "this study highlights new interpretations of systematic relations within *Crassulaceae* and the role of geography, habitat, pollinators and others ecological factors might play in the conduction of the evolution of these succulent plants," since in their study, clusters of distinct genera were presented as well as in our clusters of this study. In diverse studies, the wrong taxonomical classification of the *Crassulaceae* family has been discussed, this research study shows it is of great importance to realize a study gathering all the species of this family to elucidate the correct classification of the genera, by means of a program allowing to obtain molecular markers identifying and classifying them properly.

The total and polymorphic RAPDs fragments obtained in the characterization of twelve species of the *Crassulaceae* family, target of this research work, were higher than those obtained by García (2003) who employed genetic AFLP markers in *Crassulaceae*, in which they concluded that they obtained a total of 497 distinct bands with five used combinations, being polymorphic 375 bands (92.4 %). In another study realized by Montalvo *et al.* (2010) in plants of the *Cactaceae* family (*Pilosocereus sp.*), the use of ISTR markers was reported, in which six combinations of ISTR oligonucleotides were used, and a total of 97 bands was obtained, of which 62.8 % were polymorphic. In contrast, in the present research work, 594 bands were obtained, of which 99 % were polymorphic. Carrillo-Reyes *et al.* (2008) realized a study to identify monophyletic groups to elucidate whether *Altamiranoa* and *Villadia* must be recognized as independent genera, arguing that *Altamiranoa* was divided into two groups, *Subcampanulatae* and *Gamopetalae* but afterward they saw the variability of the inflorescence in others genera of *Crassulaceae* and proposed the fusion of both taxa under the name of *Villadia*; posteriorly, due to a wrong interpretation of the slides of the nomenclatural types of *Villadia* and *Thomsonella* Britton & Rose, and then, they decided that the legitimate name for *Thompsonella* was *Villadia* and it was transferred to all species, from *Villadia* to *Altamiranoa*; but in 1940 they detected this mistake and *Thompsonella* was separated from *Villadia* and *Altamiranoa*.

In 1996, a superposition of traits was argued, based on the phylogeny of Hart, who proposed to include *Altamiranoa* in *Sedum* and to recognize *Villadia*, but some

un género con las del otro género, similar a lo obtenido en la presente investigación en donde hay una incongruencia de agrupación genética referente a la clasificación taxonómica, en ambas investigaciones. Ellos concluyen que es necesario dilucidar las relaciones y los límites genéricos del grupo *Echeveria* y, además, en el clado de Acre como un todo.

Acevedo-Rosas (2004) estudió la filogenética molecular de *Graptopetalum* (*Crassulaceae*), concluyó diciendo "este estudio arroja nueva luz sobre las interpretaciones de las relaciones sistemáticas dentro de *Crassulaceae* y el papel que la geografía, el hábitat, los polinizadores y otros factores ecológicos pueden jugar en la conducción de la evolución de estas plantas suculentas", ya que en su estudio se presentaron agrupaciones de distintos géneros así como en nuestras agrupaciones de este estudio. En diversos estudios se ha discutido la mala clasificación taxonómica de la familia *Crassulaceae*, esta investigación muestra que es de gran importancia realizar un estudio que englobe a todas las especies de esta familia para elucidar la correcta clasificación de los géneros, mediante un programa que permita obtener marcadores moleculares que las identifiquen y clasifiquen correctamente.

Los fragmentos RAPDs totales y polimórficos obtenidos en la caracterización de doce especies de la familia *Crassulaceae*, objetivo de esta investigación, fueron mayores a los obtenidos por García (2003) quien empleo marcadores genéticos AFLP en *Crassulaceae*, en donde concluye que obtuvo un total de 497 bandas distintas con cinco combinaciones usadas, siendo polimórficas 375 (92.4 %). En otro estudio realizado por Montalvo *et al.* (2010) en plantas de la familia *Cactaceae* (*Pilosocereus sp.*), se reporta el empleo de marcadores ISTR, en donde se utilizaron seis combinaciones de oligonucleótidos ISTR, y se obtuvo el total de 97 bandas de las cuales el 62.8 % fueron polimórficas. En cambio, en la presente investigación se obtuvieron 594 bandas, de las cuales el 99 % fueron polimórficas. Carrillo-Reyes *et al.* (2008) realizaron un trabajo para identificar grupos monofiléticos para esclarecer si *Altamiranoa* y *Villadia* deben reconocerse como géneros independientes, argumentando que a *Altamiranoa* la dividieron en dos grupos, *Subcampanulatae* y *Gamopetalae* pero después vieron la variabilidad de la inflorescencia en otros géneros de *Crassulaceae* y propusieron la fusión de ambos taxones bajo el nombre de *Villadia*; posteriormente debido a una errónea interpretación de las láminas de los tipos nomenclaturales de *Villadia* y *Thomsonella* Britton & Rose, fue entonces que decidieron que el nombre legítimo para *Thompsonella* era *Villadia* y se transfirió a todas las especies de *Villadia* a *Altamiranoa*; pero en 1940 detectaron esta equivocación y se separó a *Thompsonella* de *Villadia* y *Altamiranoa*.

researchers still consider *Altamiranoa* an independent genus. As well, Mort *et al.* (2001) mention that the “Acre clade” includes a third part of *Crassulaceae* species, but is riddled with a series of unsolved relations.

Carrillo-Reyes *et al.* (2008) concluded that their combined analysis also present numerous unsolved relations and scarce groups with support. So they consider that, owing *Sedum* species are intermixed within those of all these genera, in addition of others being placed in independent groups, it is necessary to firstly define the limit and the composition of the rest of the taxa. Therefore, it may be said that *Crassulaceae* is a highly complex family; due to its easy hybridization and crossbreeding might have been not only among species of the same genus but also of different genera, being the answer to the genetic similarity they share with other genera.

The clustering of the morphological dendrogram of the twelve assessed species was not congruent with the molecular clustering, therefore there was no correspondence between the assessed morphological and molecular markers, which is coherent since they are different assessment methods and a wrong classification of species may likely exist, to confirm the aforementioned, a germplasm bank should be established to assess and correctly classify species, realize the assessment at least in two cycles, using morphological principal components that were highlighted in the present research work and run more primers allowing to properly discriminate species and allowing to locate them correctly.

Conclusions

Morphological and molecular markers detected genetic diversity among species. The obtained clustering, based on the morphological traits was congruent with the taxonomical classification since, in general, species of the same genus were clustered together. In contrast, in the molecular study, species of different genera were clustered together, indicating that there was no correspondence between the assessed morphological and molecular markers. The molecular analysis detected that species with higher genetic similarity were: *E. runyonii* and *E. derembergii*, indicating a higher genetic possibility of crossbreeding for future interspecific hybridizations.

En 1996 se argumentó una superposición de caracteres apoyándose en la filogenia de Hart, que propuso la inclusión de *Altamiranoa* en *Sedum* y el reconocimiento de *Villadia*, pero aún algunos investigadores consideran a *Altamiranoa* como un género independiente. También Mort *et al.* (2001), mencionan que el “clado Acre” comprende un tercio de las especies de crasuláceas, pero está plagado de una serie de relaciones no resueltas.

Carrillo-Reyes *et al.* (2008) concluyen que su análisis combinado muestra igualmente numerosas relaciones no resueltas y escasos grupos con soporte. Entonces consideran que debido a que las especies de *Sedum* se entremezclan con las de todos estos géneros, además de que otras se posicionan en grupos independientes, es necesario primero definir el límite y la composición del resto de los taxones. Por lo tanto, se podría decir que las *Crassulaceae* son una familia muy compleja, debido a que es fácil su hibridación y pudo haber cruzamientos no solo entre especies del mismo género sino de diferentes géneros, siendo esta la respuesta a que compartan similitud genética con otros géneros.

La agrupación del dendrograma morfológico de las doce especies evaluadas no fue congruente con la agrupación molecular, por lo cual esto indica que no hubo correspondencia entre los marcadores morfológicos y moleculares evaluados, lo cual es coherente ya que son diferentes métodos de evaluación y probablemente exista una errónea clasificación de especies, para confirmar lo anterior se tendría que establecer un banco de germoplasma para evaluar y clasificar correctamente las especies, realizar la evaluación por lo menos en dos ciclos, utilizando los componentes principales morfológicos que arrojo la presente investigación y correr más iniciadores que puedan discriminar correctamente a las especies y permitan ubicarlas correctamente.

Conclusiones

Los marcadores morfológicos y moleculares detectaron diversidad genética entre especies. La agrupación obtenida de acuerdo con las características morfológicas fue congruente con la clasificación taxonómica dado que en general agrupo a especies del mismo género. En contraste, en el estudio molecular se agruparon especies de diferentes géneros. Lo cual indica que no hubo correspondencia entre los marcadores morfológicos y moleculares evaluados. El análisis molecular detecto que las especies con mayor similitud genética fueron *E. runyonii* y *E. derembergii*, lo que indica mayor posibilidad genética de cruzamiento para hibridaciones interespecíficas futuras.

References

- Acevedo-Rosas, R., Cameron, K., Sosa, V. and Pell, S. (2004). A molecular phylogenetic study of Graptopetalum (Crassulaceae) based on ETS, ITS, RPL16, and TRNL-F nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 91: 1099-1104. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.7.1099>
- Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., Carrillo-Castañeda, G. and García-Velázquez, A. (2004). Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 551-559. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000600006>
- Avise, J. C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. New York, N Y. 7(6): 766-767. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1994.7060766.x>
- Becerra, V. V. & Paredes, C. M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudio de diversidad genética. *Agricultura técnica* (Chile), 60: 216-223. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
- Bered, F., Terra, T. F., Spellmeier, M. and Neto, J. F. B. (2005). Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5: 418-425. <https://pdfs.semanticscholar.org/293d/0a884480b6e7087da53f06d143ea82618126.pdf>
- Borys, M. W., Leszczyńska-Borys, H. and Galván, J. L. (2005). Echeveria gibbiflora D. C. –a new ornamental plant from México. I. vase life. *Acta Horticulturae*, 683: 271-277. http://wwwlib.teiep.gr/images/stories/acta/Acta%20683/683_31.pdf
- Bravo-Hollis, H. (1978). Las cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 755 p.
- Carrillo-Reyes, P., Sosa, V. and Mort, M. E. (2008). Thompsonella and the "Echeveria group" (Crassulaceae): phylogenetic relationships based on molecular and morphological characters. *Taxon*. 57:863-874. https://www.researchgate.net/publication/233690220_Thompsonella_and_the_Echeveria_group_Crassulaceae_Phylogenetic_relationships_based_on_molecular_and_morphological_characters
- Colinas, L. M. T. (2003). "Importancia de los Estudios Post-Cosecha de Plantas Ornamentales Nativas de México". In: Mejía, M.J.M. y F.A. Espinosa (comps.). *Plantas Nativas de México con Potencial Ornamental: Análisis y Perspectivas*. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 175-179.
- Eggli, U. (2003). Illustrated Handbook of succulent Plants: Crassulaceae. Springer. Zürich Switzerland. 458 p.
- García, R. I. & Pérez-Calix, E. (2007). Una nueva especie de *Echeveria* (Crassulaceae) originaria del estado de Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana* 78: 125-132. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512007000100009
- García, R. (2003). Relaciones interespecíficas del género *Pachyphytum* (Crassulaceae), empleando marcadores genéticos AFLP. Universidad de Colima, Biotecnología. Tecomán, Colima. 143 p.
- García-Ruiz, I. & Pérez-Calix, E. (2007). Una especie nueva de *Echeveria* (Crassulaceae) originaria del estado de Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 78: 125-132. <http://www.redalyc.org/pdf/574/57407809.pdf>
- Jimeno-Sevilla, H. D., Hernández-Ramírez, A. M. and Krömer, T. (2013). Echeveria rosea Lindley (Crassulaceae): a hummingbird-dependent succulent epiphyte. *Cactus and Succulent Journal*. 85: 128-131. <https://doi.org/10.2985/0007-9367-85.4.128>
- Jimeno-Sevilla, H., Hernández-Ramírez, A. M., Ornelas, J. F. and Marten-Rodríguez, S. (2014). Morphological and néctar traits in Echeveria rosea Lindley (Crassulaceae) linked to humminbird pollination in Central Veracruz, Mexico. *Haseltonia* 19:17-25. <https://doi.org/10.2985/026.019.0104>
- Jones, C. E., Shropshire, F. M., Allen, R. L. and Atallah, Y. C. (2010). Pollination and reproduction in natural and mitigation populations of the many-stemmed Dudleya, Dudleya multicaulis (Crassulaceae). *California Botanical Society* 57: 42-53pp https://www.jstor.org/stable/pdf/41425844.pdf?seq=1#page_scan_tab_contents
- López-Gutiérrez, D. M., Reyes-Agüero, J. A., Muñoz, A., Robles, J. and Cuevas, E. (2015). Comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86: 1072-1077. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.08.006>
- Maatz, Tiky. (2012) Nichi", an interesting Echeveria hybrid made in Argentina. *Cactus and Succulents Journal*. 84 (1): 30-32. <https://doi.org/10.2985/0007-9367-84.1.30>
- Martínez-Ávalos, J. G. & Mora-Olivo, A. (2000). Una nueva especie de *Echeveria* (Crassulaceae) del estado de Tamaulipas,

- México. *Acta Botánica Mexicana* 52: 43-48. <https://www.redalyc.org/pdf/574/57405203.pdf>
- Martínez-Moreno, E., Corona-Torres, T., Avitia-García, E., Castillo-González, A. M., Terrazas-Salgado, T. and Colinas-León, M. T. (2006) Caracterización morfológica de frutos y semillas de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(1): 11-17. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912103>
- Montalvo, G. F., Ortiz, G.M., Quiala, M. E., Keb-Llanes, M., Rojas, L. E., Bautista, A. M., Alonso, E. M., Quiroz, M. A., Robde, W. and Sánchez, T. L. F. (2010). Primer reporte del empleo de Marcadores ISTR en Cactaceae (*Pilosocereus* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 223-229. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18772>
- Morales, N. C. R., Avendaño, A. C., Melgoza, C. A., Gil, V. K. C; Quero, C. A., Jurado, G. P. and Martínez, S. M. (2016). Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 7(4): 455-469. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265648207005>
- Mort, M. E., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Francisco-Ortega, J. and Santos-Guerra, A. (2001). Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. *American Journal of Botany*, 88: 76-91. <https://doi.org/10.2307/2657129>
- Rendón C. A & Fernández N. R. (2007) Plantas con potencial uso ornamental del estado de Morelos, México. *Polibotánica*. 23: 121-165. <http://www.redalyc.org/pdf/621/62102308.pdf>
- Rodríguez-Rojas, T. J., Andrade-Rodríguez, M., Canul-Ku, J., Castillo-Gutiérrez, A., Martínez-Fernández, E. and Guillén-Sánchez, D. (2015). Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies *Echeveria* en condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 111-123. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000100010&script=sci_arttext&tlng=en
- Sajeva, M., & Constanzo, M. (1997). *Succulents The Illustrated Dictionary*. Ed. Timber Press. Portland, Oregon. 239p.
- Singh, G. (1999). *Plant Systematics*. Enfield, NH: Science Publishers Inc. 756 p.
- † Hart H. (1997). Taxonomic groups. Crassulaceae. In: Olfield S. (comp.) Status survey and conservation action plan. Cactus and Succulent Plants. IUCN. Cambridge, U.K. pp. 20-23
- Thiede, J. (1995). Quantitative phytogeography, species richness and evolution of American Crassulaceae. In: Evolution and systematics of the crassulaceae. (Eds.): † Hart & Eggli. Backhuys Publishers. Leiden. Netherland. 89-123. http://www.academia.edu/29809697/Thiede_J._1995_Quantitative_phytogeography_species_richness_and_evolution_of_American_Crassulaceae_In_†_Hart_H._Eggli_U._Eds._Evolution_and_systematics_of_the_Crassulaceae_Backhuys_Publishers_Leiden_pp_89-123
- Toledo, V. M. (1988). La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 81:17-30. <http://www.ejournal.unam.mx/cns/no34/CNS03407.pdf>
- Van Ham, R. C. H. J. & † Hart, H. (1998). Phylogenetic relationships in the *Crassulaceae* inferred from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal of Botany*, 85: 123-134.
- Van Ham, R. C. H. J., † Hart, H., Mes, T. H. M. and Sandbrink, J. M. (1994). Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. *Current genetics*, 25: 558-566. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00351678.pdf>
- Watson, J. W. & Eyzaguirre, P. B. (2002). Proceedings of the Second International Home Gardens Workshop: Contribution of home gardens to in situ conservation of plant genetic resources in farming systems. Winzenhausen, federal Republic of Germany. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 192 p. https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/migrated/uploads/tx_news/Home_gardens_and_in_situ_conservation_of_plant_genetic_resources_in_farming_systems_753.pdf
- Yasmin S, M. S., Islam, M., Kondoker, M., Nasiruddin, S. and Alam. (2006). Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnology*. 5(1): 27-31. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/biotech/2006/27-31.pdf>