

## Genetic diversity of sun poinsettia (*Euphorbia* spp.) in Morelos, Mexico, with RAPD molecular markers

## Diversidad genética de nochebuena de sol (*Euphorbia* spp.) en Morelos, México, con marcadores moleculares RAPD

Dante Vladimir Galindo-García<sup>1</sup>; Irán Alia-Tejaca<sup>1\*</sup>; Carlos Alberto Núñez-Colín<sup>2</sup>; María Andrade-Rodríguez<sup>1</sup>; Jaime Canul-Ku<sup>3</sup>; María Teresa Colinas-León<sup>4</sup>; Manuel de Jesús Sainz-Aispuro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad núm. 1001, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62209, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad de Guanajuato, Programa de Biotecnología. Mutualismo núm. 303, Celaya, Guanajuato, C. P. 38060, MÉXICO.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec-Galeana km 0.5, Zacatepec de Hidalgo, Morelos, C. P. 62780, MÉXICO.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco km 35.6, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

\*Corresponding author: iran.alia@uaem.mx, tel. 777 134 54 02.

### Abstract

The poinsettia is an ornamental species native to Mexico, known and distributed worldwide, which has been bred to obtain the cultivars that currently adorn homes at Christmas. The objective of this study was to determine the genetic diversity of *Euphorbia* spp., through RAPD molecular markers, in 35 genotypes collected in the state of Morelos, Mexico. The study included four sun poinsettia varieties registered in Mexico and one species of *E. leucocephala* Lotsy. Twenty-one primers of 10 random nucleotides were used, producing 91.82 % polymorphism, i.e. 203 polymorphic DNA fragments of 222 generated. From a cluster analysis a resampling test was carried out using the Jackknifing method with 1,000 replicates, forming seven consistent groups represented in a dendrogram. The accessions that presented different genetic fragments were PASCUA, ROSA, AMA 2, TVOL 2, JIU 1 and JIU 2, from Cuernavaca, Tetela del Volcán and Jiutepec, differentiated mainly by their habitat and bract color. The analyses conducted coincided in the clustering of accessions, separating *E. leucocephala* from *E. pulcherrima* because it is a different species. The results showed a wide genetic diversity of the materials collected in Morelos, with accessions of importance for future breeding studies.

**Keywords:** bract, color, PCR, clustering, diversity.

### Resumen

La nochebuena es una especie ornamental nativa de México conocida y distribuida mundialmente, que ha sido mejorada para obtener los cultivares que adornan actualmente en fiestas decembrinas. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética de *Euphorbia* spp., mediante marcadores moleculares RAPD, en 35 genotipos colectados en el estado de Morelos, México. En el estudio se incluyeron cuatro variedades de nochebuena de sol registradas en México y una especie de *E. leucocephala* Lotsy. Se utilizaron 21 iniciadores de 10 nucleótidos aleatorios que produjeron 91.82 % de polimorfismo, es decir, 203 fragmentos de ADN polimórficos de 222 generados. A partir de un análisis clúster se realizó una prueba de remuestreo por el método Jackknifing con 1,000 repeticiones y se formaron siete grupos consistentes representados en un dendrograma. Las accesiones que presentaron fragmentos genéticos distintos fueron PASCUA, ROSA, AMA 2, TVOL 2, JIU 1 y JIU 2, procedentes de Cuernavaca, Tetela del Volcán y Jiutepec, diferenciadas principalmente por su hábitat y color de brácteas. Los análisis realizados coincidieron en la agrupación de accesiones, separando a *E. leucocephala* de *E. pulcherrima* por ser una especie diferente. Los resultados obtenidos indicaron amplia diversidad genética de los materiales colectados en Morelos, con accesiones de importancia para próximos estudios de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** bráctea, color, PCR, agrupación, diversidad.



## Introduction

The poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch.) in its natural habitat is a shrub that blooms in winter and grows up to 3 m. The most important structural parts of this species are the bracts surrounding the flowers, due to their different sizes, shapes and colors (Canul-Ku et al., 2012a), and because of its beauty it is frequently used in landscaping (Taylor, López, Currey, & Janick, 2011). In Mexico, it can be found wild in its natural habitat, established in backyards and gardens, and cultivated as improved varieties for interior decoration (Canul-Ku et al., 2014).

This plant is native to northern Guerrero, Mexico (Trejo-Hernández et al., 2012), although it grows naturally in the tropical semi-deciduous forests of the Pacific coast, from Sinaloa, Mexico, to Guatemala, and in dry tropical forests of the Balsas Basin, particularly in northern Guerrero and Morelos (Trejo-Hernández, Olson-Zúñiga, & Bye-Boettler, 2015). In 2017, 18.05 million plants were established in Mexico with a production value of 576.08 million pesos (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2018), with Morelos accounting for 33.12 % of the total area established nationally, followed by Michoacán, Mexico City and Puebla (SIAP, 2018). However, the varieties available in the domestic market are produced abroad, which implies high cutting acquisition costs and agronomic management problems due to lack of adaptation (Canul-Ku et al., 2018a).

In 1950, cultivation began in Morelos of some wild poinsettia materials that differed in bract shape and color (Colinas et al., 2015), which are known as sun, backyard, heliophytic or semi-cultivated poinsettias. In recent years, there has been increased interest in these materials (Galindo-García et al., 2012) grown commercially in open-field nurseries with little technology, although information has recently been generated on their agronomic management (Galindo-García, Alia-Tejagal, Colinas-León, & Valdez-Aguilar, 2015a; Galindo-García et al., 2015b; García-Pérez et al., 2015). On the other hand, improved or shade varieties are grown in containers of different sizes and presentations for marketing during the Christmas season (Canul-Ku et al., 2014).

In the present decade, several research groups in Mexico have carried out wild and sun poinsettia collections in several states of the country (Canul-Ku, García-Pérez, Osuna-Canizales, & Ramírez-Rojas, 2012b) in order to know, conserve, protect and use this phylogenetic resource of Mexico (Galindo-García et al., 2015a), since the distribution areas of this species were reduced from one collection year to another (Canul-Ku et al., 2014). These groups have morphologically characterized 11

## Introducción

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch.) en su hábitat natural es un arbusto que florece en invierno y crece hasta 3 m. Las partes estructurales más importantes de esta especie son las brácteas que rodean a las flores, debido a sus tamaños, formas y colores diferentes (Canul-Ku et al., 2012a), y por su belleza se utiliza frecuentemente en paisajismo (Taylor, López, Currey, & Janick, 2011). En México, se puede encontrar de forma silvestre en su hábitat natural, establecida en traspatios y jardines, y cultivada como variedades mejoradas para decorar interiores (Canul-Ku et al., 2014).

Esta planta es originaria del norte de Guerrero, México (Trejo-Hernández et al., 2012), aunque crece de manera natural en los bosques tropicales subcaducifolios de la costa del pacífico, desde Sinaloa, México, hasta Guatemala, y en bosques tropicales secos de la Cuenca del Balsas, particularmente, en el norte de Guerrero y en Morelos (Trejo-Hernández, Olson-Zúñiga, & Bye-Boettler, 2015). En 2017, se establecieron en México 18.05 millones de plantas con un valor de producción de 576.08 millones de pesos (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2018), en donde Morelos participó con 33.12 % del total de la superficie establecida a nivel nacional, seguido de Michoacán, Ciudad de México y Puebla (SIAP, 2018). No obstante, las variedades disponibles en el mercado nacional se producen en el extranjero, lo que implica costos altos de adquisición de esqueje y problemas de manejo agronómico por la falta de adaptación (Canul-Ku et al., 2018a).

En 1950, inició en Morelos el cultivo de algunos materiales silvestres de nochebuena que se diferenciaban por la forma y color de brácteas (Colinas et al., 2015), los cuales se conocen como nochebuena de sol, de traspatio, eliofítica o semicultivados, y en los últimos años ha incrementado el interés por estos materiales (Galindo-García et al., 2012) cultivados comercialmente en viveros a campo abierto con escasa tecnología, aunque recientemente se ha generado información sobre su manejo agronómico (Galindo-García, Alia-Tejagal, Colinas-León, & Valdez-Aguilar, 2015a; Galindo-García et al., 2015b; García-Pérez et al., 2015). Por su parte, las variedades mejoradas o de sombra se cultivan en contenedores de diferente tamaño y presentación para su comercialización en temporada navideña (Canul-Ku et al., 2014).

En la presente década, diversos grupos de investigación en México han realizado colectas de nochebuena silvestre y de sol en varios estados del país (Canul-Ku, García-Pérez, Osuna-Canizales, & Ramírez-Rojas, 2012b) con la finalidad de conocer, conservar, proteger y utilizar este recurso fitogenético de México (Galindo-

sun poinsettia varieties, which are registered in the *Catálogo Nacional de Variedades Vegetales de México* (National Catalogue of Plant Varieties of Mexico) (Colinas et al., 2015; Galindo-García et al., 2015a); in addition, Mexican varieties derived from improvement by hybridization of wild poinsettia accessions have been generated (Canul-Ku et al., 2017, 2018a; Canul-Ku, García-Pérez, Barrios-Gómez, & Rangel-Estrada, 2018b). However, these materials have not been molecularly characterized, which could serve to know their variation and genetic diversity for use in breeding programs or other activities (Canul-Ku et al., 2014).

Improved or shade poinsettias have been characterized with RAPD (Ling, Sauve, & Gawe, 1997), DAF (Starman, Duan, & Abbit, 1999) and AFLP (Parks & Moyer, 2004) markers. These techniques have been efficient in identifying poinsettia cultivars, determining relationships among cultivars and developing markers for important characteristics in closely related varieties. There are few works with molecular markers in sun and wild poinsettias (Trejo-Hernández et al. 2012, 2015; Trejo-Hernández, Briones-Dumas, Gómez-Bermejo, & Olson, 2018); however, these were done for phylogeny and evolutionary history purposes, and not to determine their diversity.

It is important to know the variability and genetic diversity of sun poinsettias in Morelos for their use and conservation, as well as to identify them, study them and use them in future research and breeding programs. Therefore, the present study was carried out to determine the genetic diversity, through RAPD markers, of 35 accessions of *Euphorbia* spp. collected in the state of Morelos, Mexico.

## Materials and methods

The experimental trial was carried out at the Autonomous University of the State of Morelos' Experimental Station's Agricultural Production Laboratory, located in Cuernavaca, Morelos, Mexico. We used the RAPD molecular marker technique (Williams, Kubelik, Levak, & Tingey, 1990) and the protocol described by Doyle and Doyle protocol (1987) for DNA isolation, with some modifications recommended by Andrade-Rodríguez, Villegas-Monter, Gutiérrez-Espinosa, Carrillo-Castañeda, and García-Velázquez (2005). Thirty-five accessions collected in 19 municipalities of Morelos were studied, 34 of the species *E. pulcherrima* (most with red bracts, one with pink bracts and two with yellow ones) and one of *E. leucocephala* (with white bracts) (Table 1). Collections included four poinsettia varieties registered in the *Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas* (National Catalogue of Plant Varieties of the National Seed Inspection and Certification Service) (SNICS, 2018): 'Valenciana' (VAL),

García et al., 2015a), ya que las áreas de distribución de esta especie se redujeron de un año de colecta a otro (Canul-Ku et al., 2014). Estos grupos han caracterizado, morfológicamente, 11 variedades de nochebuena de sol, las cuales están registradas en el *Catálogo Nacional de Variedades Vegetales de México* (Colinas et al., 2015; Galindo-García et al., 2015a); además, se han generado variedades mexicanas derivadas del mejoramiento por hibridación de accesiones de nochebuena silvestre (Canul-Ku et al., 2017, 2018a; Canul-Ku, García-Pérez, Barrios-Gómez, & Rangel-Estrada, 2018b). Sin embargo, dichos materiales no se han caracterizado molecularmente, lo cual podría servir para conocer su variación y diversidad genética para su uso en programas de mejoramiento genético u otras actividades (Canul-Ku et al., 2014).

En nochebuenas mejorada o de sombra se han realizado caracterizaciones con marcadores RAPD (Ling, Sauve, & Gawe, 1997), DAF (Starman, Duan, & Abbit, 1999) y AFLP (Parks & Moyer, 2004), lo cual ha resultado eficiente para identificar cultivares de nochebuena, determinar las relaciones entre los cultivares y desarrollar marcadores para características importantes en las variedades estrechamente relacionadas. En nochebuenas de sol y silvestre existen pocos trabajos con marcadores moleculares (Trejo-Hernández et al. 2012, 2015; Trejo-Hernández, Briones-Dumas, Gómez-Bermejo, & Olson, 2018); no obstante, estos se realizaron con fines de filogenia e historia evolutiva, y no de conocer su diversidad.

Es importante conocer la variabilidad y diversidad genética de las nochebuenas de sol en Morelos para su uso y conservación, además de identificarlas, estudiarlas y emplearlas en futuras investigaciones y programas de mejoramiento genético. Por ello, el presente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar la diversidad genética, mediante marcadores RAPD, de 35 accesiones de *Euphorbia* spp. colectadas en el estado de Morelos, México.

## Materiales y métodos

El ensayo experimental se realizó en el laboratorio de Producción Agrícola del Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, localizada en Cuernavaca, Morelos, México. Se empleó la técnica de marcadores moleculares RAPD (Williams, Kubelik, Levak, & Tingey, 1990) y el protocolo de Doyle y Doyle (1987) para el aislamiento de ADN, con algunas modificaciones recomendadas por Andrade-Rodríguez, Villegas-Monter, Gutiérrez-Espinosa, Carrillo-Castañeda, y García-Velázquez (2005). Se estudiaron 35 accesiones colectadas en 19 municipios de Morelos, 34 de la especie *E. pulcherrima* (en su mayoría de brácteas de color rojo, una rosa y dos amarillas) y una de *E. leucocephala* (con brácteas de color

**Table 1. Accessions collected in different municipalities of Morelos.****Cuadro 1. Accesiones colectadas en diferentes municipios de Morelos.**

Accession / Accesión	Key / Clave	Community / Localidad	Municipality / Municipio	Bract color / Color de brácteas	Nectary development / Desarrollo de nectarios
1	CUE 1	Ocotepec	Cuernavaca	Red/Rojo	Present/Presente
2	REH 1 <sup>a</sup>	Santa María Ahuacatlán	Cuernavaca	Red/Rojo	Absent/Ausente
3	REH 2	Ocotepec	Cuernavaca	Red/Rojo	Present/Presente
4	CUE 4	Tetela del Monte	Cuernavaca	Red/Rojo	Present/Presente
5	VAL <sup>a</sup>	Tetela del Monte	Cuernavaca	Red/Rojo	Absent/Ausente
6	CUE 5	Tetela del Monte	Cuernavaca	Red/Rojo	Absent/Ausente
7	ROSA <sup>a</sup>	Tetela del Monte	Cuernavaca	Pink/Rosa	Present/Presente
8	A. NAV <sup>a</sup>	Tetela del Monte	Cuernavaca	Yellow/Amarillo	Present/Presente
9	PASCUA	Tetela del Monte	Cuernavaca	White/Blanco	Present/Presente
10	BM 1	Buenavista del Monte	Cuernavaca	Red/Rojo	Present/Presente
11	BM 2	Buenavista del Monte	Cuernavaca	Red/Rojo	Absent/Ausente
12	AMA 2	Ocotepec	Cuernavaca	Yellow/Amarillo	Present/Presente
13	CUE 13	Ocotepec	Cuernavaca	Red/Rojo	Absent/Ausente
14	TEP 1	Tepoztlán	Tepoztlán	Red/Rojo	Absent/Ausente
15	TEP 2	Tepoztlán	Tepoztlán	Red/Rojo	Present/Presente
16	YAU	Yautepec	Yautepec	Red/Rojo	Present/Presente
17	TLALT	San Miguel 30	Tlaltizapán	Red/Rojo	Present/Presente
18	PIXTL	Puente de Ixtla	Puente de Ixtla	Red/Rojo	Absent/Ausente
19	MIAC	Miacatlán	Miacatlán	Red/Rojo	Absent/Ausente
20	TET	Tetecala	Tetecala	Red/Rojo	Absent/Ausente
21	COATLAN	Coatlán del Rio	Coatlán del Rio	Red/Rojo	Absent/Ausente
22	TYC 1	Tlayacapan	Tlayacapan	Red/Rojo	Absent/Ausente
23	TYC 2	San Andrés	Tlayacapan	Red/Rojo	Absent/Ausente
24	TLALN	Tlalnepantla	Tlalnepantla	Red/Rojo	Absent/Ausente
25	TOTO	Totolapan	Totolapan	Red/Rojo	Present/Presente
26	OCU	Santa Mónica	Ocuituco	Red/Rojo	Absent/Ausente
27	TVOL 1	Tetela del Volcán	Tetela del Volcán	Red/Rojo	Present/Presente
28	TVOL 2	San Miguel	Tetela del Volcán	Red/Rojo	Present/Presente
29	ZACU	Tlacotepec	Zacualpan	Red/Rojo	Absent/Ausente
30	CUA	Gabriel Tetepa	Cuautla	Red/Rojo	Absent/Ausente
31	JIU 1	El Texcal	Jiutepec	Red/Rojo	Present/Presente
32	JIU 2	El Texcal	Jiutepec	Red/Rojo	Present/Presente
33	TEPAL	Atotonilco	Tepalcingo	Red/Rojo	Absent/Ausente
34	AXO	Axochiapan	Axochiapan	Red/Rojo	Absent/Ausente
35	TLAQ	Las Garzas	Tlaquiltenango	Red/Rojo	Absent/Ausente

a = Registered varieties.

a = Variedades registradas.



'Rehilete' (REH 1), 'Juan Pablo' (ROSA) and 'Amanecer Navideño' (A. NAV) (Table 1).

DNA was isolated from 75 mg of tissue from fresh young leaves of five clonal plants from the 35 accessions to quantify it, amplify it and evaluate its quality. Quantification was performed in a spectrophotometer (DR5000, HACH®, Germany) using readings in two optical densities (OD). With the ratio of the absorbance reading at 260 and 280 nm (DO<sub>260</sub>/280), the purity of the nucleic acids was estimated and the DNA concentration was calculated with the following formula:

$$\text{DNA concentration } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{260} \cdot \text{dilution factor} (100) \cdot 50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}}{1000}$$

The degree of DNA integrity was determined by electrophoresis from a 2-μL aliquot of the DNA sample in ultrapure agarose gel (Invitrogen®) at 1 % (Andrade-Rodríguez et al., 2005). The electrophoresis chamber (75-2321, Apollo®, USA) operated at 80 V for 1 h; later, the obtained gel was placed in a gel documentation system (GVM20, Syngene®, United Kingdom) to be photographed on a computer (MT-M8131-35U, IBM®, USA) using the Canon® ZoomBrowser photo editor.

Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) was performed with 21 random decapier primers (Table 2), selected from 60 previously tested indicators. The reaction mixture contained 10 μL of dNTPs, 2 μL of loading buffer (PCR buffer), 1.5 μL of magnesium chloride (MgCl), 4.7 μL of sterile deionized distilled water (sddw) and 0.3 μL (1.5 U) of native Taq® DNA polymerase enzyme (Invitrogen®). Amplification was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique, for which a thermal cycler (TC-412, Techne®, United Kingdom) was used with the following

blanco) (Cuadro 1). Entre las colectas se incluyeron cuatro variedades de nochebuena de sol registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2018): 'Valenciana' (VAL), 'Rehilete' (REH 1), 'Juan Pablo' (ROSA) y 'Amanecer Navideño' (A. NAV) (Cuadro 1).

El ADN se aisló a partir de 75 mg de tejido de hojas jóvenes frescas de cinco plantas clonales de las 35 accesiones para cuantificarlo, amplificarlo y evaluar su calidad. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (DR5000, HACH®, Alemania) mediante lecturas en dos densidades ópticas (DO). Con la relación de la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm (DO<sub>260</sub>/280) se estimó la pureza de los ácidos nucleicos y se calculó la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{DO}_{260} \cdot \text{factor de dilución} (100) \cdot 50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}}{1000}$$

El grado de integridad del ADN se determinó por electroforesis a partir de una alícuota de 2 μL de la muestra de ADN en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen®) al 1 % (Andrade-Rodríguez et al., 2005). La cámara de electroforesis (75-2321, Apollo®, EUA) trabajó a 80 V durante 1 h; posteriormente, el gel obtenido se colocó en un fotodocumentador (GVM20, Syngene®, Reino Unido) para fotografiarse en computadora (MT-M8131-35U, IBM®, EUA) mediante el editor de fotografías Zoombrowser de Cannon®.

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) se realizó con 21 iniciadores aleatorios decámeros (Cuadro 2), seleccionados de 60 indicadores probados previamente. La mezcla de

**Table 2. Primers used in DNA amplification.**

**Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la amplificación de ADN.**

Primer/Iniciador	Base sequence/Secuencia de base	Primer/Iniciador	Base sequence/Secuencia de base
1	5' AGG GGT CTT G 3'	12	5' GTA GAC CCG T 3'
2	5' GAA ACG GGT G 3'	13	5' AGG GAA CGA G 3'
3	5' GGG TAA CGC C 3'	14	5' CCA CAG CAG T 3'
4	5' CAA TCG CCG T 3'	15	5' GTG AGG CGT C 3'
5	5' AGG TGA CCG T 3'	16	5' CCG CAT CTA C 3'
6	5' CAA ACG TCG G 3'	17	5' GAA CGG ACT C 3'
7	5' GTT GCG ATC C 3'	18	5' CTC ACC GTC C 3'
8	5' GTT TCG CTC C 3'	19	5' AAG CCT CGT C 3'
9	5' TGC TCT GCC C 3'	20	5' CAC ACT CCA G 3'
10	5' GGT GAC GCA G 3'	21	5' ACT TCG CCA G 3'
11	5' CTG CTG GGA C 3'		

A = denine; G = guanine; T = thymine; C = cytosine./

A = adenina; G = guanina; T = timina; C = citosina.

program: one pre-denaturation cycle at 94 °C for 4 min, 36 denaturation cycles at 94 °C for 1 min, annealing at 36 °C for 1 min and polymerization at 72 °C for 2 min, and an extension at 72 °C for 10 min (Andrade-Rodríguez et al., 2005).

Amplified fragments were separated by electrophoresis, with the same chamber and photograph conditions described previously, from 24 µL of the PCR reaction mixture in ultrapure agarose gel (Invitrogen®) at 1.5 % (Andrade-Rodríguez et al., 2005). The size of the fragments produced by the RAPD markers was obtained with Genetools® software.

The polymorphism percentages were obtained by dividing the number of bands generated by the polymorphic bands. The polymorphic information content (PIC) was obtained with the formula  $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$  (Fernández, Soto, Salazar, & Betancourt, 2010; Roldán-Ruiz, Dendauw, Van Bockstaele, Depicker, & de Loose, 2000), where  $f_i$  is the frequency of the bands where this presents the indicator  $i$  and the  $PIC_i$  is the PIC average of all the bands of said primer  $i$ . The PIC was used to determine the primers that generated more polymorphic information in the evaluated accessions.

A cluster analysis was applied using the Dice similarity coefficient (Nei & Li, 1979) and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), which is the most appropriate combination for this type of study according to Núñez-Colín and Escobedo-López (2011). Additionally, a resampling test was performed using the Jackknifing method (Efron, 1979), with 1,000 replicates, using the Free Tree® program ver. 0.9.1.50 (Pavliček, Hrdá, & Flerg, 1999). Resampling methods are used to obtain numerical data on the consistency of the tree generated, and have been commonly used to decrease standard errors and confidence intervals (Mohammadi & Prassana, 2003). Subsequently, a dendrogram was drawn with the Tree View® program ver. 1.6.6 (Page, 1996) and was split into groups according to the resampling values, taking as reference the point where there was 100 % certainty.

Finally, a principal coordinates analysis was made (Gower, 2005) with the NTSYS® program ver. 2.1p. (Rohlf, 2000) to have a three-dimensional representation of the accessions and to be able to corroborate the cluster analysis groups.

## Results and discussion

A total of 222 bands were revealed, of which 203 were polymorphic in the DNA amplification of the 35 accessions studied (Table 3); in addition, 100 % polymorphism was obtained in 10 primers used (1, 2, 5, 7, 11, 14, 15, 18, 20 and 21), with an average of 91.82 % (Table 3). In commercial poinsettia varieties, Ling et

reacción contenía 10 µL de dNTPs, 2 µL de amortiguador de carga (buffer PCR), 1.5 µL de cloruro de magnesio (MgCl), 4.7 µL de agua destilada desionizada estéril (adda) y 0.3 µL (1.5 U) de enzima Taq® ADN polimerasa nativa (Invitrogen®). La amplificación se realizó con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para la cual se utilizó un termociclador (TC-412, Techne®, Reino Unido) con el siguiente programa: un ciclo de predesnaturalización a 94 °C por 4 min, 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 36 °C por 1 min y polimerización a 72 °C por 2 min, y una extensión a 72 °C por 10 min (Andrade-Rodríguez et al., 2005).

La separación de fragmentos amplificados se realizó por electroforesis, con las mismas condiciones de la cámara y fotografía descritas previamente, a partir de 24 µL de la mezcla de reacción de PCR en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen®) al 1.5 % (Andrade-Rodríguez et al., 2005). El tamaño de los fragmentos producidos por los marcadores RAPD se obtuvieron con el programa Genetools®.

Los porcentajes de polimorfismo se obtuvieron dividiendo el número de bandas generadas entre las bandas polimórficas. El contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) se obtuvo con la formula  $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$  (Fernández, Soto, Salazar, & Betancourt, 2010; Roldán-Ruiz, Dendauw, Van Bockstaele, Depicker, & de Loose, 2000), donde  $f_i$  es la frecuencia de las bandas donde está presente el indicador  $i$  y el  $PIC_i$  es el promedio de PIC de todas las bandas de dicho iniciador  $i$ . El PIC se utilizó para determinar los iniciadores que generaron más información polimórfica en las accesiones evaluadas.

Se aplicó un análisis clúster mediante el coeficiente de similitud de Dice (Nei & Li, 1979) y el método de ligamiento promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA, por sus siglas en inglés), que es la combinación más adecuada para este tipo de estudios de acuerdo con Núñez-Colín y Escobedo-López (2011). Adicionalmente, se realizó una prueba de remuestreo por el método Jackknifing (Efron, 1979), con 1,000 repeticiones, mediante el programa Free Tree® ver. 0.9.1.50 (Pavliček, Hrdá, & Flerg, 1999). Los métodos de remuestreo se emplean con el fin de obtener datos numéricos de consistencia del árbol generado, y han sido utilizados comúnmente para disminuir los errores estándar e intervalos de confianza (Mohammadi & Prassana, 2003). Posteriormente, se dibujó un dendrograma con el programa Tree View® ver. 1.6.6 (Page, 1996) y se partió en grupos de acuerdo con los valores de remuestreo, tomando como referencia el punto donde se tuviera el 100 % de certeza.

Finalmente, se hizo un análisis de coordenadas principales (Gower, 2005) con el programa NTSYS®

**Table 3. Number of fragments found, polymorphism percentage and polymorphic information content.****Cuadro 3. Número de fragmentos encontrados, porcentaje de polimorfismo y contenido de información polimórfica.**

Primer/ Iniciador	Total bands/ Total de bandas	Polymorphic bands/ Bandas polimórficas	Unique bands/ Bandas únicas	Monomorphic bands/ Bandas monomórficas	Polymorphism (%)/ Polimorfismo (%)	PIC <sup>1</sup>
1	8	8	2	0	100	0.18
2	12	12	5	0	100	0.15
3	12	9	4	3	75	0.06
4	10	9	2	1	90	0.11
5	9	9	3	0	100	0.13
6	10	8	2	2	80	0.14
7	11	11	1	0	100	0.24
8	15	12	4	3	80	0.09
9	9	7	2	2	77.78	0.06
10	7	6	3	1	85.71	0.16
11	9	9	0	0	100	0.20
12	14	12	3	2	85.71	0.18
13	11	9	2	2	81.82	0.20
14	10	10	4	0	100	0.18
15	11	11	2	0	100	0.19
16	9	8	2	1	88.89	0.20
17	11	10	1	1	90.91	0.11
18	12	12	4	0	100	0.12
19	13	12	2	1	92.31	0.21
20	8	8	0	0	100	0.30
21	11	11	4	0	100	0.10
Total	222	203	52	19	-	-
Mean	10.57	9.67	2.48	0.90	91.82	0.16

<sup>1</sup>PIC = polymorphic information content./<sup>1</sup>PIC = contenido de información polimórfica.

al. (1997) obtained 69 % polymorphism with 33 out of 48 registered polymorphic bands, well below that obtained in the present study, perhaps because they only evaluated commercial varieties; in addition, they reported that 42 out of 57 indicators were totally monomorphic. In this case, primers 8, 12 and 19 produced a greater number of fragments of *Euphorbia* genotypes and more than 80 % polymorphism.

The total number of amplified bands ranged from 7 to 15, with an average of 10.5 bands per primer (Table 3). This value was higher than the 5.4 bands, on average, reported in shade poinsettias (Ling et al., 1997). The average PIC obtained was 0.16, with primer 20 obtaining the highest value, followed by 6 and 19 (Table 3), which indicates the discriminatory power of these markers when differentiating the genotypes studied, so its use is recommended in future studies of *Euphorbia*. Likewise, 52 unique bands were identified, of which PASCUA presented 46, ROSA and JIUT 1 two, and TVOL 1 and TVOL 2 only one (Table 2).

ver. 2.1p. (Rohlf, 2000) para tener una representación tridimensional de las accesiones y poder corroborar los grupos del análisis clúster.

## Resultados y discusión

Se revelaron en total 222 bandas, de las cuales 203 fueron polimórficas en la amplificación del ADN de las 35 accesiones estudiadas (Cuadro 3); además, se obtuvo 100 % de polimorfismo en 10 iniciadores utilizados (1, 2, 5, 7, 11, 14, 15, 18, 20 y 21), con un promedio de 91.82 % (Cuadro 3). En variedades comerciales de nochebuena, Ling et al. (1997) obtuvieron 69 % de polimorfismo con 33 bandas polimórficas de 48 registradas, muy por debajo del obtenido en el presente estudio, esto quizás porque únicamente evaluaron variedades comerciales; además, reportaron que 42 indicadores, de 57, fueron totalmente monomórficos. En este caso, los iniciadores 8, 12 y 19 produjeron un mayor número de fragmentos de los genotipos de *Euphorbia* y más de 80 % de polimorfismo.

High genetic variability was detected among and within the species studied according to their polymorphism percentages and PIC values. In addition, the PASCUA, TVOL 2, ROSE, AMA 2, JIU 1 and JIU 2 accessions showed greater polymorphism in their obtained DNA fragments, as well as a greater number of unique fragments (Figure 1).

From the cluster analysis, seven groups were formed with 100 % consistency and genetic differences among them, which indicates a wide genetic diversity of the accessions collected in Morelos (Figure 2). The group with the highest number of integrated accessions was 2 with 21, followed by group 1 with eight, group 5 with two and the rest of the groups with only one accession, which indicates the differences presented (Figure 2).

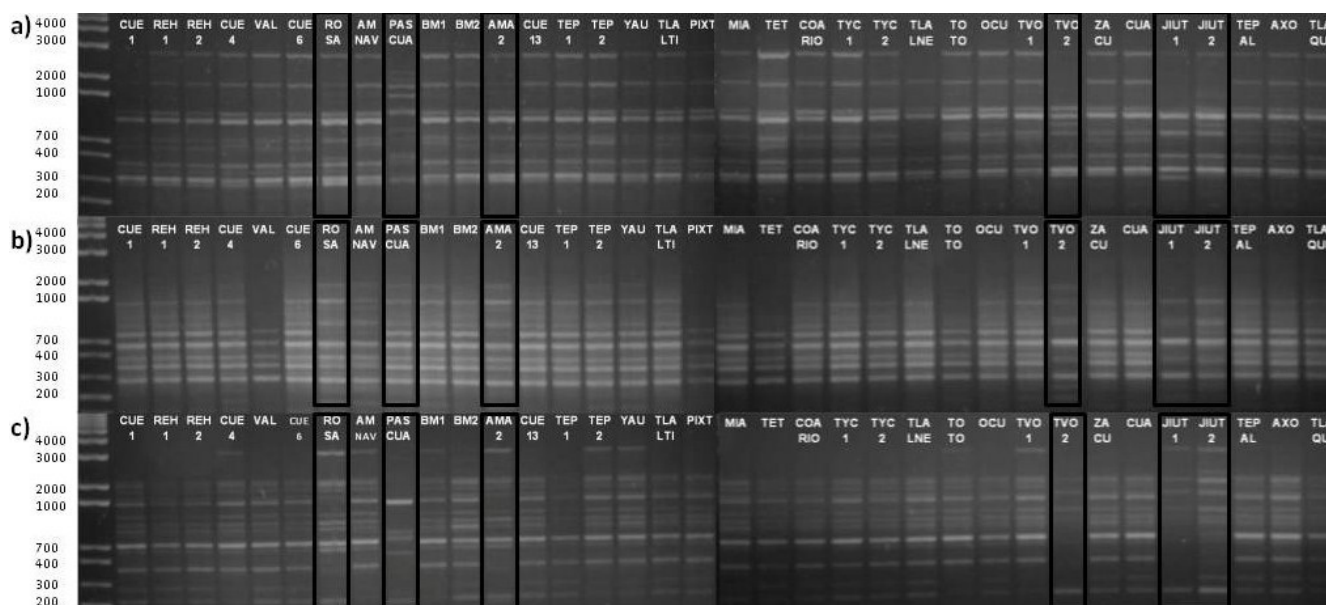
According to Mohammadi and Prasanna (2003), percentages greater than 70 in the internal branches of the dendrogram are acceptable. In this case, values higher than 93 % were obtained, and in 18 branches 100 % was obtained, values adequate for the formation and consistency of the created groups (Tapia-Pérez & Legaria-Solano, 2007) (Figure 2). The proportions of the internal branches of the dendrogram can be used to demonstrate the consistency of the groups, as has been used in some crops: *Jatropha curcas* L. (Pecina-Quintero et al., 2011), sesame (*Sesamum indicum* L.) (Salazar, Laurentin, Dávila, & Castillo, 2006) and guava (*Psidium guajava* L.) (Tapia-Pérez & Legaria-Solano, 2007), to characterize molecularly or identify genetic variability. In addition, these values are useful to

El número total de bandas amplificadas variaron entre 7 y 15, con un promedio de 10.5 bandas por iniciador (Cuadro 3). Este valor fue superior a las 5.4 bandas, en promedio, reportadas en nochebuenas de sombra (Ling et al., 1997). El promedio del PIC obtenido fue de 0.16, en donde el iniciador 20 obtuvo el mayor valor, seguido del 6 y 19 (Cuadro 3), lo que indica el poder discriminatorio de estos marcadores al diferenciar los genotipos estudiados, por lo que se recomienda su uso en futuros estudios de *Euphorbia*. Asimismo, se identificaron 52 bandas únicas, de las cuales PASCUA presentó 46, ROSA y JIUT 1 presentaron dos, y TVOL 1 y TVOL 2 sólo uno (Cuadro 2).

Se detectó alta variabilidad genética entre y dentro de las especies estudiadas de acuerdo con sus porcentajes de polimorfismo y sus valores de PIC. Además, las accesiones PASCUA, TVOL 2, ROSA, AMA 2, JIU 1 y JIU 2 presentaron mayor polimorfismo en sus fragmentos de ADN obtenidos, así como mayor número de fragmentos únicos (Figura 1).

A partir del análisis clúster se formaron siete grupos con 100 % de consistencia y con diferencias genéticas entre ellos, lo que indica amplia diversidad genética de las accesiones colectadas en Morelos (Figura 2). El grupo con mayor número de accesiones integradas fue el 2 con 21, seguido del 1 con ocho, el grupo 5 con dos y el resto de los grupos con una sola accesión, lo que concuerda con las diferencias presentadas (Figura 2).

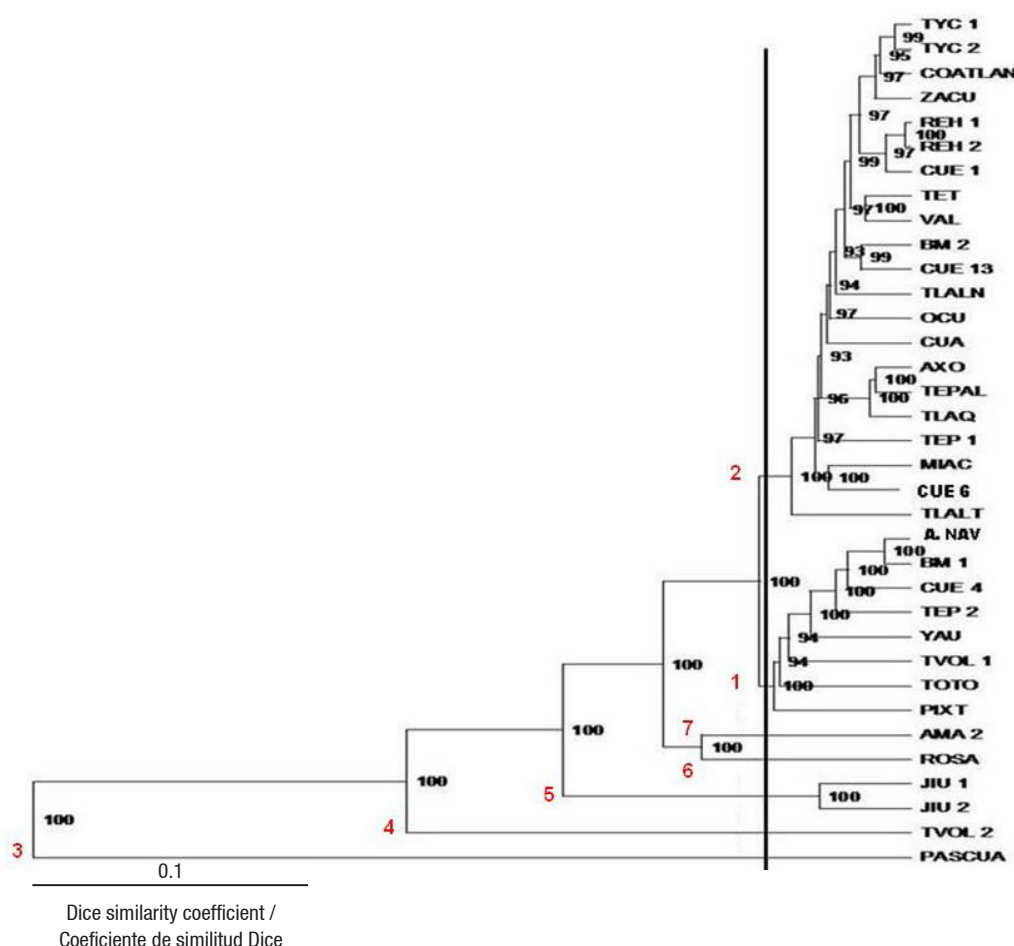
De acuerdo con Mohammadi y Prasanna (2003), los porcentajes mayores a 70 en las ramificaciones



**Figure 1. DNA amplification of accessions collected in Morelos, Mexico, in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Only three primers of the 21 used are shown: a) 8, b) 13 and c) 19.**

**Figura 1. Amplificación de ADN de accesiones colectadas en Morelos, México, en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Sólo se muestran tres iniciadores de los 21 empleados: a) 8, b) 13 y c) 19.**





**Figure 2. Molecular characterization dendrogram, by means of the Dice similarity coefficient, of 35 accessions collected in Morelos, Mexico.**

**Figura 2. Dendrograma de caracterización molecular, mediante el coeficiente de similitud de Dice, de 35 accesiones colectadas en Morelos, México.**

determine the cut of the dendrogram, taking into account the branches that present 100 %.

Group 1 was characterized by the presence of sun poinsettia plants that developed nectaries, except the PIXT accession (Figure 2 and 3a). All accessions of this group had red bracts, except A. NAV (pink bracts) which is a variety registered in Mexico, suggesting that the genetic content is similar in the others (Figure 2).

The plants of group 2 presented red bracts, in addition to grouping two registered accessions (REH 1 and VAL). The REH 1 and REH 2 accessions have deformed bracts, so they probably arose as a modification of the 'Valenciana' poinsettia (Figure 3b). The 'Valenciana' and 'Rehilete' sun varieties are the most cultivated in Morelos (Galindo-García et al., 2012), which is why this group is the most numerous.

Groups 1 and 2 presented collected materials and registered varieties of sun poinsettia, so it can be inferred that the latter are the result of domestication

internas del dendrograma son aceptables. En este caso se obtuvieron valores superiores a 93 %, y en 18 ramificaciones se logró 100 %, valores adecuados para la formación y consistencia de los grupos creados (Tapia-Pérez & Legaria-Solano, 2007) (Figura 2). Las proporciones de las ramificaciones internas del dendrograma pueden servir para demostrar la consistencia de los grupos, como se ha utilizado en algunos cultivos: *Jatropha curcas* L. (Pecina-Quintero et al., 2011), ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) (Salazar, Laurentin, Dávila, & Castillo, 2006) y guayaba (*Psidium guajava* L.) (Tapia-Pérez & Legaria-Solano, 2007), para caracterizar molecularmente o identificar variabilidad genética. Además, dichos valores son útiles para determinar el corte del dendrograma, tomando en cuenta las ramificaciones que presenten el 100 %.

El grupo 1 se caracterizó por presentar plantas de nochebuena de sol que desarrollaron nectarios, excepto la accesión de PIXT (Figura 2 y 3a). Todas las accesiones de este grupo presentaron brácteas de color rojo, menos A. NAV (brácteas color rosa) que es una

of species due to the transport of plants from one place to another, since the first settlers in the large cities dispersed to other municipalities and took this plant material (Trejo-Hernández et al., 2015), although another option is that the inhabitants obtained the plant material from wild populations to decorate their gardens (Trejo-Hernández et al., 2018).

Six pairs of accessions in group 2 were very similar genetically to each other: TYC 1 and 2, REH 1 and 2, TET and VAL, BM 2 and CUE 13, AXO and TEP, MIAC and CUE 6. The CUE 1 accession is close to REH 1 and 2, and TLAQ is close to AXO and TEP 1, possibly due to the gene flow reported by Tapia-Pérez and Legaria-Solano (2007). These authors state that the similarity among accessions can be caused by two factors: transport of seeds by birds and transport of seeds or cuttings of genotypes by producers to propagate them. This paper suggests that inhabitants of other municipalities bought sun poinsettia plants in Cuernavaca and took them back to their places of origin. Trejo-Hernández et al. (2015) state that there are no known natural hybrids of this plant, so it is suggested that the dispersion of the sun poinsettia has been by cuttings.

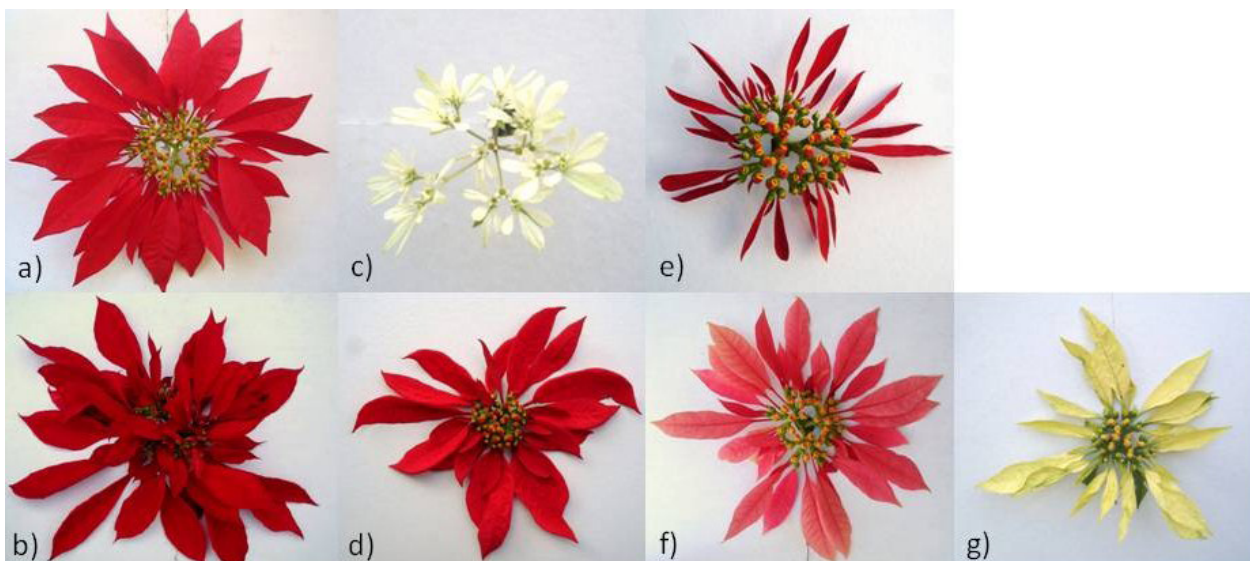
Group 3 consisted of only the PASCUA accession (*E. leucocephala*) collected in Cuernavaca, which showed nectary development and very small white bracts (Figure 3c). This accession belongs to another species, which coincides with it having the greatest number of different DNA fragments, separating it from the others

variedad registrada en México, lo que se sugiere que el contenido genético es similar en las demás (Figura 2).

Las plantas del grupo 2 presentaron brácteas de color rojo, además de agrupar dos accesiones registradas (REH 1 y VAL). Las accesiones REH 1 y REH 2 tienen brácteas deformadas, por lo que probablemente surgieron como una modificación de la nochebuena 'Valenciana' (Figura 3b). Las variedades de sol 'Valenciana' y 'Rehilete' son las más cultivadas en Morelos (Galindo-García et al., 2012), por ello este grupo es el más numerosos.

Los grupos 1 y 2 presentaron materiales recolectados y variedades registradas de nochebuena de sol, por lo que se puede inferir que estas últimas son el resultado de la domesticación de especies debido al transporte de plantas de un lugar a otro, ya que los primeros pobladores de las grandes ciudades se dispersaron hacia otros municipios y se llevaron este material vegetal (Trejo-Hernández et al., 2015). Aunque otra opción es que los habitantes hayan obtenido el material vegetal de poblaciones silvestres para adornar sus jardines (Trejo-Hernández et al., 2018).

Seis pares de accesiones en el grupo 2 fueron muy similares genéticamente entre sí: TYC 1 y 2, REH 1 y 2, TET y VAL, BM 2 y CUE 13, AXO y TEP, MIAC y CUE 6. La accesión de CUE 1 está cerca de REH 1 y 2, y TLAQ está cerca de AXO y TEP 1, posiblemente debido al flujo genético reportado por Tapia-Pérez y Legaria-Solano (2007). Estos autores mencionan que la similitud



**Figure 3.** Examples of accessions that showed the greatest genetic diversity of each group: a) group 1 (TEP 2), b) group 2 (VAL), c) group 3 (PASCUA), d) group 4 (TVOL 2), e) group 5 (JIU 1), f) group 6 (ROSA) and g) group 7 (AMA 2).

**Figura 3.** Ejemplos de accesiones que presentaron mayor diversidad genética de cada grupo: a) grupo 1 (TEP 2), b) grupo 2 (VAL), c) grupo 3 (PASCUA), d) grupo 4 (TVOL 2), e) grupo 5 (JIU 1), f) grupo 6 (ROSA) y g) grupo 7 (AMA 2).

in the dendrogram (Figure 2). Likewise, group 4 was also formed by one accession (TVOL 2) (Figure 3d), which has red bracts, nectary development and a slight deformation of bracts, so it is inferred that it may be a wild material, since it was collected in a natural habitat in Tétela del Volcán. This corroborates the result obtained with TVOL 2, which was genetically different from the others, and presented a unique fragment and a fragment that only coincided with one of PASCUA.

Group 5 consisted of two accessions: JIU 1 and JIU 2 (Figure 3e), with red bracts and nectary development, both from Texcal, Jiutepec, Morelos, and wild habitat. In Jiutepec there is an important population of *Euphorbia pulcherrima* in an ecological conservation area decreed in 1992, currently declared as a protected natural area (Comisión Estatal del Agua y Medio Ambiente [CEAMA], 2018). Trejo-Hernández et al. (2015) indicate that apparently wild plants develop simple inflorescences with genetic variants. In JIU 1 and JIU 2, three unique fragments were identified, i.e., they did not appear in other accessions, which placed them in a different group.

Group 6 was formed by the ROSE genotype (Figure 3f), which has pink bracts and nectary development, giving rise to simple inflorescences. Finally, group 7 consisted of the AMA 2 accession (Figure 3e), which develops nectaries and thin yellow bracts with slight deformation. It is suggested that its habitat is natural because it is located within the city limits of Cuernavaca and shows similarity with ROSA, since they coincide in having two fragments only presented by both genotypes.

The genetic variability of the accessions originating in Morelos is mainly attributed to the collection site, since the wild plants showed differences in their genotype, which implies that varietal purity is preserved (Fernández et al., 2010). Another correlation variable was bract color, where most of the accessions from different municipalities in Morelos are red and those of different color were concentrated in Cuernavaca: PASCUA (white), AMA 2 and A. NAV (yellow), and ROSE (pink); in addition, the registered varieties were grouped according to bract color: 'Amanecer Navideño' (A. NAV-yellow) in group 1, 'Valenciana' and 'Rehilete' (VAL and REH-red) in group 2, and 'Juan Pablo' (ROSA-pink) in group 6. This coincides with Prasad (2014), who reported that the color of the flowers in *Hibiscus rosasinensis* determines the grouping of accessions.

The grouping of the 35 accessions collected in Morelos was shown to be consistent in the seven groups well-defined in the cluster analysis and represented in the principal coordinates analysis plot (Figure 4), which were differentiated by habitat and bract color. In this three-dimensional scatter plot, one can notice the

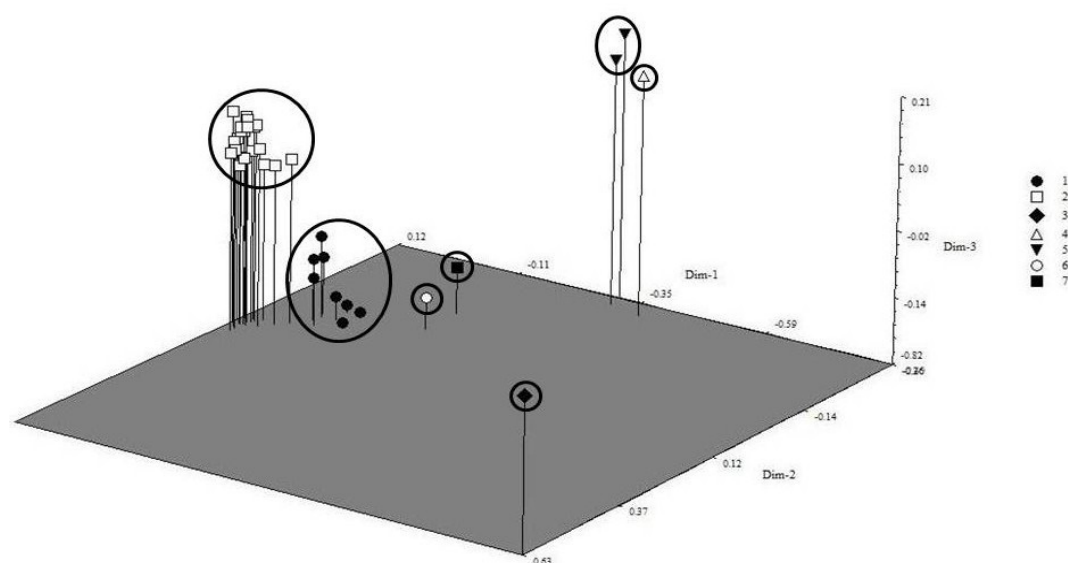
entre accesiones puede ser originada por dos factores: transporte de semilla por aves y transporte semillas o esquejes de genotipos por los productores para propagarlos. En este trabajo se sugiere que habitantes de otros municipios compraron plantas de nochebuena de sol en Cuernavaca y se las llevaron a sus lugares de origen. Trejo-Hernández et al. (2015) mencionan que no se conocen híbridos naturales de esta planta, por lo que se sugiere que la dispersión de la nochebuena de sol ha sido por esquejes.

El grupo 3 se integró únicamente por la accesión PASCUA (*E. leucocephala*) colectada en Cuernavaca, la cual presentó desarrollo de nectarios y brácteas muy pequeñas de color blanco (Figura 3c). Esta accesión pertenece a otra especie, lo que coincide con que tuvo el mayor número de fragmentos de ADN diferentes, alejándola de las demás en el dendrograma (Figura 2). Asimismo, el grupo 4 también se formó por una accesión (TVOL 2) (Figura 3d), la cual presenta brácteas color rojo, desarrollo de nectarios y una ligera deformación de brácteas, por lo que se infiere que puede ser un material silvestre, ya que se colectó en un hábitat natural en Tétela del Volcán. Lo anterior corrobora el resultado obtenido con TVOL 2, que fue genéticamente diferente a las demás, y presentó un fragmento único y un fragmento que sólo coincidió con uno de PASCUA.

El grupo 5 se integró por dos accesiones: JIU 1 y JIU 2 (Figura 3e), con brácteas rojas y desarrollo de nectarios, ambas originarias de Texcal, Jiutepec, Morelos, y de hábitat silvestre. En Jiutepec existe una población importante de *Euphorbia pulcherrima* en un área de conservación ecológica decretada en 1992, actualmente declarada como área natural protegida (Comisión Estatal del Agua y Medio Ambiente [CEAMA], 2018). Trejo-Hernández et al. (2015) indican que las plantas de apariencia silvestre desarrollan inflorescencias simples y con variantes genéticas. En JIU 1 y JIU 2 se identificaron tres fragmentos únicos, es decir, que no se presentaron en otras accesiones, lo que las colocó en un grupo diferente.

El grupo 6 se formó por el genotipo ROSA (Figura 3f), el cual presenta brácteas de color rosa y desarrollo de nectarios, lo que da lugar a inflorescencias simples. Finalmente, el grupo 7 se integró por la accesión AMA 2 (Figura 3e) que desarrolla nectarios y brácteas delgadas de color amarillo con ligera deformación. Se sugiere que su hábitat es natural por localizarse en los límites de la ciudad de Cuernavaca y presentar similitud con ROSA, ya que coinciden en la presencia de dos fragmentos que únicamente presentan ambos genotipos.

La variabilidad genética de las accesiones originarias de Morelos se atribuye principalmente al lugar de colecta, ya que las plantas silvestres mostraron diferencias en su genotipo, lo que implica que se conserva la



**Figure 4. Three-dimensional scatter plot, obtained by principal coordinates analysis, of the 35 accessions collected in Morelos, Mexico.**

**Figura 4. Gráfica tridimensional de dispersión, obtenida mediante el análisis de coordenadas principales, de las 35 accesiones colectadas en Morelos, México.**

distance of PASCUA (group 3) with the others, as it is a different species.

Nectary development was found in 16 accessions (CUE 1, REH 2, CUE 4, ROSA, A. NAV, AMA 2, PASCUA, BVM 1, TEP 2, YAU, TLALTI, TOTO, TVOL 1, TVOL 2, JIU 1 and JIU 2), which is of utmost importance due to the possible crossing between plants. The rest of the accessions did not have nectaries, so they did not develop seed and instead sprouted some structures known as bracteoles (Colinas et al., 2015). These accessions cannot be used in crosses because they are present in all the groups described here. Identifying and crossing genetically distant genotypes increases the probability of having heterosis in the system (Wright, 1978).

The analysis of genetic diversity allowed obtaining a reliable grouping of the accessions collected in Morelos. In addition, groups of core accessions were identified with the possibility of using them in future breeding studies (Mohammadi & Prasanna, 2003; Valera-Montero, Hernández-Dávila, Silos-Espino, & Flores-Benítez, 2017).

## Conclusions

Molecular characterization allowed the detection of a wide genetic diversity of accessions collected in Morelos, Mexico, with important characteristics to be used in future breeding programs. With RAPD molecular markers and statistical analyses, the collected accessions were differentiated and grouped, identifying 203 polymorphic fragments (91.82 %) that determined

pureza varietal (Fernández et al., 2010). Otra variable de correlación fue el color de bráctea, en donde la mayoría de las accesiones de diferentes municipios de Morelos son de color rojo y las de diferente color se concentraron en Cuernavaca: PASCUA (blancas), AMA 2 y A. NAV (amarillas), y ROSA (rosas); además, las variedades registradas se agruparon de acuerdo con el color de brácteas: 'Amanecer Navideño' (A. NAV-amarillas) en grupo 1, 'Valenciana' y 'Rehilete' (VAL y REH-rojas) en grupo 2, y 'Juan Pablo' (ROSA-rosas) en grupo 6. Esto coincide con Prasad (2014), quien reportó que el color de las flores en *Hibiscus rosasinensis* determina la agrupación de accesiones.

La agrupación de las 35 accesiones colectadas en Morelos se mostró consistente en los siete grupos bien definidos en el análisis clúster y representados en la gráfica del análisis de coordenadas principales (Figura 4), los cuales se diferenciaron por su hábitat y color de brácteas. En esta gráfica se puede notar la distancia de PASCUA (grupo 3) con las demás, al ser una especie diferente.

El desarrollo de nectarios se presentó en 16 accesiones (CUE 1, REH 2, CUE 4, ROSA, A. NAV, AMA 2, PASCUA, BVM 1, TEP 2, YAU, TLALTI, TOTO, TVOL 1, TVOL 2, JIU 1 y JIU 2), lo que es de suma importancia debido al posible cruzamiento entre plantas. El resto de las accesiones no presentaron nectarios, por lo que no desarrollan semilla y en su lugar brotaron unas estructuras conocidas como bractéolas (Colinas et al., 2015). Estas accesiones no pueden ser utilizadas en cruces debido a que están presentes en todos los grupos aquí descritos. El identificar y cruzar genotipos distantes genéticamente



the degree of genetic diversity in the study population. Seven consistent groups were formed, which were associated with their bract color and habitat. The accessions that presented the greatest variability in their DNA fragments were PASCUA, TVOL 2, JIU 1, JIU 2, ROSA and AMA 2. The species *E. leucocephala* was different from *E. pulcherrima* in its genotype.

### End of English version

## References / Referencias

- Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Carrillo-Castañeda, G. & García-Velázquez, A. (2005). Poliembriónia y marcadores RAPD para la identificación de plántulas cigóticas y nucleares en *Citrus*. *Agrociencia*, 39(4), 371-383. Retrieved from <https://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2005/jul-ago/art-2.pdf>
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Campos-Bravo, E., Barrios-Gómez, E., Cruz-Torres, E., García-Andrade, J. M., Osuna-Canizales, F. J., & Ramírez-Rojas, S. (2012a). Efecto de la irradiación sobre la nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 31(8), 1495-1507. doi: 10.29312/remexca.v3i8.1316
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Osuna-Canizales, F. J., & Ramírez-Rojas, S. (2012b). *Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Barrios-Gómez, E., Osuna-Canizales, F. J., Ramírez-Rojas, S., Alia-Tejacal, I., & Montoya-Contreras, R. E. (2014). Caracterización morfológica de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2(2), 16-23. Retrieved from <http://www.somecta.org.mx/Revistas/CYTAM2.2/CYTAM-2014-2-12.pdf>
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Barrios-Gómez, E., Rangel-Estrada, S. E., Ramírez-Rojas, S., & Osuna-Canizales, F. J. (2017). Alondra: nuevo híbrido de nochebuena para interiores. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1203-1208. doi: 10.29312/remexca.v8i5.119
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Barrios-Gómez, E. J., Osuna-Canizales, F. J., Rangel-Estrada, S. E., & Ramírez-Rojas, S. G. (2018a). Rubí, nueva variedad Mexicana de nochebuena para interior. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 41(1), 91-92. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-1/12a.pdf>
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Barrios-Gómez, E. J., & Rangel-Estrada, S. E. (2018b). Formación de híbridos clonales en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Revista Fitotecnica Mexicana*, 41(3), 311-316. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-3/11a.pdf>
- permite incrementar la probabilidad de tener heterosis en el sistema (Wright, 1978).
- El análisis de diversidad genética permitió obtener una agrupación confiable de las accesiones colectadas en Morelos. Además, se identificaron grupos de accesiones núcleo con la posibilidad de utilizarlos en próximos estudios de mejoramiento genético (Mohammadi & Prasanna, 2003; Valera-Montero, Hernández-Dávila, Silos-Espino, & Flores-Benítez, 2017).

## Conclusiones

La caracterización molecular permitió detectar amplia diversidad genética de accesiones colectadas en Morelos, México, con características de importancia para utilizarse en próximos programas de mejoramiento genético. Con los marcadores moleculares RAPD y los análisis estadísticos se diferenciaron y agruparon las accesiones colectadas, identificándose 203 fragmentos polimórficos (91.82 %) que determinaron el grado de diversidad genética en la población de estudio. Se formaron siete grupos consistentes, los cuales se asociaron con el color de brácteas y su hábitat. Las accesiones que presentaron mayor variabilidad en sus fragmentos de ADN fueron PASCUA, TVOL 2, JIU 1, JIU 2, ROSA y AMA 2. La especie *E. leucocephala* fue diferente a *E. pulcherrima* en su genotipo.

### Fin de la versión en español

- Colinas, L. M. T., Espinosa, A., Mejía, M. J., Rodríguez, M. A., Pérez, M. L., & Alia, T. I. (2015). Cultivars of *Euphorbia pulcherrima* from Mexico. *Acta Horticulturae*, 1104, 487-490. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1104.70
- Comisión Estatal del Agua y Medio Ambiente (CEAMA). (2018). *Sistema estatal de áreas naturales protegidas*. Retrieved from <http://www.ceamamorelos.gob.mx>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The Annals of Statistics*, 7(1), 1-26. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2958830>
- Fernández, H., Soto, E., Salazar, E., & Betancourt, M. (2010). Análisis RAPD entre y dentro de poblaciones derivadas de girasol silvestre x cultivado. *Agronomía Tropical*, 60(3), 263-269. Retrieved from [http://sian.inia.gob.ve/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at6003/pdf/at6003\\_fernandez\\_h.pdf](http://sian.inia.gob.ve/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at6003/pdf/at6003_fernandez_h.pdf)
- Galindo-García, D. V., Alia-Tejacal, I., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., Canul-Ku, J., & Sainz-Aispuro, M. J. (2012). Producción de nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos, México.

- Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4), 751-763. doi: 10.29312/remexca.v3i4.1428
- Galindo-García, D. V., Alia-Tejacal, I., Colinas-León, M. T. B., & Valdez-Aguilar, L. A. (2015a). *Caracterización agronómica de la nochebuena de sol (Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotzsch)*. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Galindo-García, D. V., Alia-Tejacal, I., Valdez-Aguilar, L. A., Colinas-León, M. T., Villegas-Torres, O. G., López-Martínez, V., Sainz-Aispuro, M. J., & Guillén-Sánchez, D. (2015b). Extracción de macronutrientes y crecimiento en variedades de nochebuena de sol nativas de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(3), 305-312. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/38-3/8a.pdf>
- García-Pérez, F., Canul-Ku, J., Osuna-Canizalez, F. J., Ramírez-Rojas, S. G., Rangel-Estrada, S. E., & Portas-Fernández, B. (2015). *Propagación de nochebuena de sol (Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotzsch)*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Gower, J. C. (2005). Principal coordinates analysis. In: Armitage, P., & Colton, T. (Ed.), *Encyclopedia of biostatistics* (pp. 3514-3518). Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Ling, J. T., Sauve, R., & Gawe, M. (1997). Identification of poinsettia cultivars using RAPD markers. *Hortscience*, 32(1), 122-124. doi: 10.21273/HORTSCI.32.1.122
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248. doi: 10.2135/cropsci2003.1235
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76, 5269-5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415-427. doi: 10.15517/am.v22i2.8746
- Page, R. D. M. (1996). Tree view: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12(4), 357-358. doi: 10.1093/bioinformatics/12.4.357
- Parks, E. J., & Moyer, J. W. (2004). Evaluation of AFLP in poinsettia: polymorphism, selection, analysis, and cultivar identification. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 129(6), 863-869. doi: 10.21273/JASHS.129.6.0863
- Pavliček, A., Hrdá, S., & Flegr, J. (1999). Free Tree—freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)*, 45(3), 97-99. Retrieved from <http://www.flegr.com/wp-content/uploads/2017/05/FL14-freetree.pdf>
- Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J. L., Zamarripa-Colmenero, A., Montes-García, N., Núñez-Colín, C. A., Solís-Bonilla, J. L., ... & Mejía-Bustamante, D. J. (2011). Molecular characterization of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1897-1905. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.027
- Prasad, M. P. (2014). Molecular characterization and genetic diversity determination of *Hibiscus* species using RAPD molecular markers. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 4(3), 50-56.
- Rohlf, F. J. (2000). *Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. User Guide*. New York, USA: Exeter Software.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., & de Loose, M. (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6(2), 125-134. doi: 10.1023/A:1009680614564
- Salazar, B., Laurentin, H., Dávila, M., & Castillo, M. A. (2006). Reliability of the RAPD technique for germplasm analysis of sesame (*Sesamum indicum* L.) from Venezuela. *Interciencia*, 31(6), 456-460. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33911712.pdf>
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2018). *Catálogo Nacional de Variedades Vegetales*. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Retrieved from <http://snics.sagarpa.gob.mx>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). *Cierre de la producción (1980-2017)*. Retrieved from <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Starman, T. W., Duan, X., & Abbitt, S. (1999). Nucleic acids scanning techniques distinguish closely related cultivars of poinsettia. *HortScience*, 34(6), 1119-1122. Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/34/6/1119.full.pdf+html>
- Tapia-Pérez, D., & Legaria-Solano, J. P. (2007). Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 391-401. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/30-4/6a.pdf>
- Taylor, J. M., López, R. G., Currey, C. J., & Janick, J. (2011). The poinsettia: history and transformation. *Chronica Horticulturae*, 51, 23-28. Retrieved from <https://www.ishs.org/system/files/chronica-documents/ch5103.pdf>
- Trejo-Hernández, L., Feria-Arroyo, T., Olsen, K. M., Eguiarte, L. E., Arroyo, B., Gruhn, J. A., & Olson, M. E. (2012). Poinsettia's wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany*, 99(7), 1146-1157. doi: 10.3732/ajb.1200072
- Trejo-Hernández, L., Olson-Zúñiga, M. E., & Bye-Boettler, R. A. (2015). Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(2), 478-485. doi: 10.1016/j.rmb.2015.04.033
- Trejo-Hernández, L., Briones-Dumas, E., Gómez-Bermejo, R., & Olson, M. E. (2018). Molecular evidence for repeated

- recruitment of wild christmas poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) into traditional horticulture in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(2). doi: 10.1007/s10722-018-0727-1
- Valera-Montero, L. L., Hernández-Dávila, A., Silos-Espino, H., & Flores-Benítez, S. (2017). Variación genética en guayaba mediante RAPDs y descriptores morfológicos en Calvillo, Aguascalientes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(1), 65-75. doi: 10.29312/remexca.v8i1.72
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Levak, K. J., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago.