

Clasificación y estimación de la diversidad genética de Nopal *Opuntia spp* en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares¹ (Con 4 Tablas y 3 Figuras)

Classification and estimation of genetic diversity in Nopal *Opuntia spp* based on phenotypic descriptors and genetic-molecular markers

(With 4 Tables & 3 Figures)

García-Zambrano² Eduardo A, Adriana Gutiérrez-Díez, Gilberto E Salinas-García, Elizabeth Cárdenas-Cerda, Rigoberto E Vázquez-Alvarado, Francisco Zavala-García, Jesús Martínez de la Cerda

Resumen. El objetivo de esta investigación fue desarrollar y aplicar marcadores moleculares de tipo RAPD para la estimación de la diversidad genética de 100 accesiones de nopal que forman el Banco de Germoplasma de la FAUANL. Los datos moleculares fueron evaluados por medio del análisis multivariado, utilizando los métodos de Ward y UPGMA; estos resultados se compararon con datos fenotípicos tomados de las mismas accesiones, evaluados por los métodos ya mencionados. Para lograr este objetivo se modificó el protocolo para la extracción del DNA de nopal con el fin de reducir la cantidad de polisacáridos y su influencia en la calidad de la extracción. Posteriormente, se desarrolló un protocolo para la generación de marcadores moleculares del tipo RAPD para nopal y así agrupar las accesiones del banco por el grado de similitud de los marcadores moleculares, en concordancia con datos fenotípicos.

Palabras clave: marcadores moleculares, RAPD, accesión, PCR.

Abstract. The objective of this investigation was to develop and apply molecular markers (type RAPD) for estimating the genetic diversity of 100 *Opuntia accessions* from the Germoplasma Bank of the FAUANL. The molecular data were evaluated by multivariate analysis using the methods of Ward and UPGMA. These results were compared with phenotypic data taken from the same accessions, already evaluated by the above mentioned methods. The protocol was modified for the extraction of the *Opuntia* DNA to reduce the quantity of polysaccharides and their influence in its quality. Later on, a protocol was developed for the generation of molecular markers of the type RAPD for *Opuntia* accessions. This allowed to combine the accessions by the similarity degree of the molecular markers, in agreement with phenotypic data.

Key words: molecular markers, RAPD, accession, PCR

¹ Trabajo realizado en la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Apartado Postal 358, San Nicolás de los Garza N.L. C.P. 66450. México

² Maestro-Investigador Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México egarcil@hotmail.com.

La característica más notable de las regiones áridas y semiáridas de México es la gran diversidad de su cubierta vegetal. Componentes de esta cubierta vegetal son las especies del género *Opuntia* que han representado para los mexicanos en su desarrollo histórico, uno de los elementos bióticos más relevantes y de mayor significado cultural (Granados et al., 1996). En México, por nopal se reconoce a las plantas de la familia Cactaceae de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*. El nopal *Opuntia spp* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Sin embargo, es México donde se encuentra la mayor diversidad genética a nivel inter e intraespecífico. México ha sido reconocido como el centro de origen y dispersión de este género (Bravo H, 1978) y esta riqueza genética debe ser considerada como parte del patrimonio del país, por lo que se debe dar atención a su conservación, mejoramiento y uso así como, hacer de ellos un elemento activo en el desarrollo del país. Un banco de germoplasma concentra los recursos genéticos de una o varias especies; sus principales funciones son la conservación, exploración, documentación e intercambio de dichos recursos (Cenis JL, 2000). El establecimiento de colecciones esenciales de nopal basados en la variación genética que muestran las accesiones sería lo más deseable; sin embargo, generalmente no se dispone de estimaciones precisas y confiables de la diversidad genética presente dentro de las colecciones. El propósito esencial y fundamental de cualquier clasificación es organizar los miembros de una población en grupos o clases, para que la naturaleza y las interacciones entre ellos sean fácilmente entendidas (Arkley RJ, 1976).

La identificación de variedades se ha basado tradicionalmente en la descripción de los caracteres observables de las plantas. Sin embargo, esta descripción es necesariamente lenta, debido al gran número de caracteres que hay que observar y a la necesidad de hacerlo en unas condiciones controladas para minimizar la variabilidad natural de éstos. Un gran adelanto fue el desarrollo de los marcadores moleculares (Cenis JL, 2000). Los marcadores moleculares basados en el DNA poseen características ventajosas puesto que sus resultados no son afectados por el ambiente y están disponibles en un número casi ilimitado, abundantes y aplicables a todos los organismos (Nelson RJ, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal incluido para el desarrollo de esta investigación consiste en cladodios jóvenes de las accesiones del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León ubicada en Marín, N.L., México. Estas accesiones fueron establecidas a través de muestreos realizados en diferentes estados del país. A partir de 1996 se establecieron las primeras 52 accesiones, posteriormente en 1999 se incrementaron a 110.

Evaluación molecular. Se utilizaron marcadores moleculares del tipo RAPD (amplificación aleatoria de DNA polimórfico). Williams et al. (1993) señalan que este es un método para crear impresión digital genómica a partir de especies en las cuales no se conoce la secuencia que se va a amplificar. Para lograr la amplificación de DNA de nopal con la técnica de RAPD se siguió como base el protocolo de Williams et al. (1993), estandarizado y optimizado para las condiciones de nuestro laboratorio.

Como se observa en la Tabla 1, la técnica de RAPD se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tiene la particularidad que se utiliza como iniciador un oligonucleótido de secuencia aleatoria y tamaño de 10 a 12 bases y no es necesario conocer el genoma de la especie (Williams et al., 1993).

Tabla 1. Pasos para la generación de RAPD para nopal
Pasos para la generación de RAPD
<ul style="list-style-type: none"> •Extracción de DNA •Cuantificación del DNA •Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) •Separación de fragmentos amplificados por electroforesis •Observación de polimorfismos por tinción con Bromuro de etidio y observación en luz ultravioleta •Almacenamiento de la Información utilizando fotografía

Aislamiento de DNA en cactáceas. El aislamiento del DNA cactáceo es notoriamente difícil por contener altas cantidades de polisacáridos y metabolitos secundarios cuya forma insoluble complica la extracción (Maréchal Drouard et al., 1995)). Los polisacáridos son visualmente evidentes por su viscosidad, siendo una textura pegajosa que hace que el DNA sea inmanejable en los tubos y difícil de amplificar en la reacción en cadena de la polimerasa (Porebski et al., 1997). El método que se usó para extraer DNA de nopal es el protocolo modificado del método de fraccionamiento subcelular (Saldaña A, 1998).

Cuantificación del rendimiento y pureza del DNA. La concentración de DNA se estimó por el método descrito por Sambrook et al. (1998) en una dilución 1:100 en la que se registró la absorbancia en dos longitudes de onda (260nm/280nm).

La relación entre la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm (A260/280) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de DNA tienen valores que van desde 1.8 a 2 a dichas absorbancias, respectivamente. Si hay una contaminación con proteínas o fenol, el valor obtenido en esta relación puede ser significativamente diferente para los valores citados y no será posible la cuantificación correcta de las moléculas (Sambrook et al., 1998).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó una rigurosa pre-selección de iniciadores para RAPD utilizando en las pruebas preliminares los grupos de iniciadores OPA (1-20) y OPG (1-20) de Operon Technologies (Alameda, CA, USA), identificando 12 iniciadores: OPG-02, OPG-03, OPG-04, OPG-05, OPG-07, OPG-08, OPG-18, OPG-19, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-11. Dichos iniciadores rindieron productos de amplificación (RAPD) con un subconjunto de 10 accesiones dentro de las 100 que forman el banco. Se produjeron 20 loci polimórficos bien definidos. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 ml. Sus componentes y reacciones se presentan en la Tabla 2.

Se marcaron los tubos de acuerdo al número de cada accesión procesada realizando una mezcla con todos los componentes del PCR (cóctel), exceptuando al DNA. De cada accesión, la cantidad requerida por reacción fue colocada en tubos para PCR (200 µl) colocando hasta el final el DNA de cada muestra. Las muestras fueron colocadas en un termociclador BIORAD; el programa térmico utilizado fue un ciclo inicial de 93°C, 1 min; 45 ciclos de 92°C por 1 min, 36°C por 1 min y 71°C por 1 min, y un ciclo final de 72°C por 5 min. El termociclador tiene

Tabla 2. Componentes para la preparación de las muestras para PCR	
Reactivo	[Fnal]
Solución amortiguadora para Taq (10X)	1X
MgCl ₂	2.5 mM
Mezcla de deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (10 mM)	0.04 mM
Enzima Taq polimerasa	1U
Iniciador	15 ng
DNA	20 ng
dd H ₂ O	completar a 25 ml

una capacidad de 24 muestras y el tiempo en que se realizaron las muestras fue de 4 h y 15 min, pudiendo por lo tanto procesar 48 muestras por jornada de trabajo. Se realizó PCR para RAPD a las muestras utilizando los grupos de iniciadores OPA (01 al 20) y OPG (01 al 20), los cuales fueron diluidos en buffer TE. Se realizaron ensayos preliminares con cada uno de los 40 iniciadores, utilizando DNA extraído de las accesiones elegidas al azar, con el propósito de seleccionar a los iniciadores que produjeron amplificación con una o más accesiones de este subgrupo. Los iniciadores que produjeron productos de amplificación se utilizaron para generar RAPD con el grupo completo de 100 accesiones.

Los productos de amplificación se cargaron en un gel de agarosa al 1% utilizando 5 ml de amortiguador de carga 6X (azul de bromofenol 0.25%, sacarosa 40%) para separarse por electroforesis a 120 V por 2.5 horas. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb ladder (Promega Corporation, Madison, WI, USA) Se tiñó el gel con bromuro de etidio (1mg/ml) en agitación constante durante 20 minutos. La visualización se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta, se tomaron fotografías de los geles con películas Polaroid blanco y negro (8.5 x 10.8 cm), así como con cámara digital para su posterior análisis.

Análisis de la información. Los patrones de fragmentos amplificados (bandas) que se obtuvieron con los iniciadores probados fueron analizados visualmente para generar una matriz de datos a partir de aquellas bandas bien definidas que se presentaron con cada iniciador. Estos datos fueron registrados como variables discretas binarias, utilizando 1 para indicar presencia de la banda y 0 para indicar ausencia. Se tomaron como idénticos las bandas amplificados en diferentes individuos si tenían el mismo peso molecular. Con esta matriz de datos (ceros y uno) se construyó la matriz de las distancias genéticas mediante la comparación de cada par de genotipos utilizando los métodos Nei y Li (1979). Estas matrices contienen las distancias entre todos los posibles pares de individuos.

$$\text{Distancia Genética (A, B)} = \frac{\sum_i |A_i - B_i|}{N}$$

donde:

A_i = presencia o ausencia de banda de la accesión A_i, tomando un marcador molecular

B_i = presencia o ausencia de banda de la accesión B_i, tomando un marcador molecular

N = número total de marcadores

Análisis de conglomerados. Existen varios métodos de agrupamiento como el análisis de ligamiento simple, el de análisis de ligamiento promedio, el análisis de ligamiento complejo y el análisis de similaridad de McQuitty utilizando los datos binarios (0,1). Con el propósito de agrupar las accesiones se utilizaron los métodos de Ward y el de promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA) (Ortega, 1978). Además se comprobaron los grupos formados por medio de un análisis discriminante. Rincón et al. (1996) sugieren que el método de promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA) puede servir como un método adecuado de agrupamiento para accesiones de maíz utilizando datos agronómicos y morfológicos; asimismo señala que el método de Ward puede utilizarse como una alternativa. Si el número de individuos se incrementa considerablemente, el método de Ward puede ser menos apropiado, es un método específico que puede dividir los datos en grupos densos de una forma aceptable (James et al., 1990).

La distancia entre dos conglomerados por medio del método de Ward es la suma de los cuadrados de las diferencias entre dos conglomerados sumados por todas las variables; en cambio, el método de UPGMA comienza igual que los métodos de encadenamiento simple o completo. El criterio de aglomeración es la distancia media de un conglomerado con todos los individuos del otro. Esta técnica no depende de los valores extremos y la partición se basa en todos los miembros de los conglomerados en lugar de un par único de miembros extremos (Hair et al., 1999). Se construyeron dendogramas a partir de cada método probado en cada una de las matrices. Estos análisis se realizaron utilizando los programas SPSS versión 8 y STATISTICA versión 6 (StatSoft, Inc. 1998). Con el programa STATISTICA se obtuvieron la lista de los grupos formados así como las accesiones que forman cada grupo con sus respectivas distancias euclidianas, los análisis de varianza y los estadísticos descriptivos para cada variable.

Los grupos formados fueron probados mediante un análisis discriminante utilizando la matriz de datos moleculares y de distancias genéticas, con la finalidad de avalar de manera estadística los datos generados. Al hacer este análisis se obtuvo el porcentaje de variación y la correlación canónica que existe entre las variables; además da el pronóstico de acierto de los grupos generados (Garza, 1995).

Debido a la gran similitud presente entre las accesiones se realizó una evaluación fenotípica siguiendo los lineamientos propuestos por la FAO, en la cual se midieron cinco variables cuantitativas y nueve cualitativas. La información fenotípica se generó a través de visitas periódicas semanales desde septiembre de 1998 hasta marzo de 1999. Se seleccionaron las plantas de acuerdo a la cantidad de estas dentro de cada una de las accesiones, considerando por lo tanto tres plantas por accesión. Se seleccionaron aquellos ejemplares que presentaban la misma apariencia fenotípica, marcando en cada planta tres cladodios provenientes de la parte baja, media y alta de la planta. En los cladodios se midieron las siguientes variables: vigor, tamaño, forma de la planta, alternancia, hábito de crecimiento; edad, forma, color y espinas en el cladodio, serosidad; largo, ancho, grosor del cladodio; altura de la planta, total de cladodios, área de cobertura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de DNA. Los resultados se observan en la Tabla 3. Se usó el protocolo modificado del método de fraccionamiento subcelular. Los resultados fueron satisfactorios, ya

que se redujo la cantidad de polisacáridos antes de extraer los ácidos nucleicos en comparación al protocolo propuesto por Saldaña (1998), facilitando el manejo de las muestras.

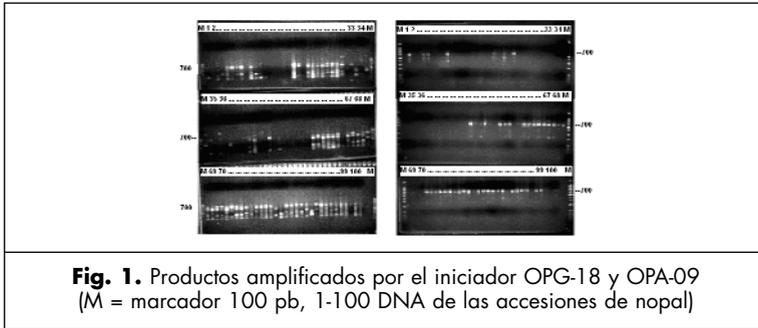
El tejido fresco es el más adecuado para la extracción, ya que se obtuvo una concentración de 5.35 mg/ml en la accesión Amarillo 2289, en la cual es mayor la cantidad de DNA obtenida de la misma accesión con cladodios maduros cuyo valor es de 0.5 mg/ml. Otra ventaja observada fue la facilidad del manejo del tejido, debido a la ausencia de espinas que dificultan su colecta, obteniendo una mejor calidad del DNA comparado a los cladodios maduros.

Estadístico	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	Concentración ng/µl
Máximo	0.107	0.080	107.000	5.35
Mínimo	0.001	0.001	0.037	0.05
Media	0.028	0.015	4.271	1.37
Desviación estándar	0.002	0.001	1.142	0.096

Generación de datos moleculares. Se amplificaron 34 bandas, de las cuales 14 amplificaron de manera inconsistente anulándose para los análisis. Los datos obtenidos por los 12 iniciadores (OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-11, OPG-02, OPG-03, OPG-04, OPG-05, OPG-07, OPG-08, OPG-18, OPG-19) produjeron entre dos a cinco bandas polimórficas por iniciador cuyo peso molecular por banda fluctuó entre 200 y 1000 pb. Los iniciadores OPA-07 y OPG-03 presentaron un 86 y 90% de productos de amplificación, respectivamente con respecto a las 100 accesiones estudiadas. Los iniciadores OPG-04 y OPG-07 fueron los que menos amplificaciones presentaron, ya que solo generaron banda con un 16 y 14 % de las accesiones, respectivamente. Cuando se usó el iniciador OPA-07 se observaron bandas muy definidas, aunque el OPA-08, OPA-09, OPG-18 amplificaron para la mayoría de las muestras. En la Fig.1 se pueden ver algunas fotografías de estos geles. Con la suposición de que las 100 accesiones estudiadas representan una muestra aleatoria en equilibrio genético de la "población del nopal" del Altiplano y de la Llanura Costera del Golfo de México, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas así como el índice de diversidad y la frecuencia de heterocigotos para cada loci.

El índice de diversidad (ID) promedio obtenido en nopal es de 0.8307 en comparación con los obtenidos en agave (0.578) para RAPD y los valores ya reportados en papa (0.326) y en cebada (0.521) (Milboun et al., 1997). Se observaron valores estimados altos debido a que este análisis se hizo en el banco de germoplasma donde la variabilidad genética entre las accesiones es alta. Los RAPD permiten asignar una taxonomía específica a accesiones no clasificadas o a aquellas clasificadas incorrectamente por criterios tradicionales. A partir de esta técnica se generaron 20 marcadores moleculares con los cuales se generó una matriz de datos de 20 x 100.

Análisis de los datos moleculares con el método de Ward. En el dendrograma presentado en la Fig. 2, se observa que los grupos se empiezan a formar a distancias muy reducidas, entre un rango aproximado de 0 a 7 unidades. Utilizando la distancia euclidiana al cuadrado se separan más los grupos. Se observa la formación de dos grandes grupos bien definidos. El primer grupo formando por 38 accesiones tiene como característica que la mayoría de



sus accesiones se usan como verdura; en el segundo grupo, el 98% de las accesiones se utilizan para la producción de fruta.

Los resultados del análisis discriminante presentaron un 100% de varianza entre los grupos con una correlación canónica de 0.951, presentando un 100% acumulado en ambos. Rincón et al. (1996) determinaron que un dendograma es considerado como una buena representación de una matriz de asociaciones si el coeficiente de correlación canónica es 0.85 o mayor. Sin embargo, los valores bajos no significan que el dendograma no es útil; sólo que alguna distorsión puede ocurrir. Es decir, de acuerdo al coeficiente de correlación obtenido, el dendograma generado a partir de esta matriz de distancia genética es adecuado para representar la similitud existente entre las accesiones que se encuentran en el banco de germoplasma.

Análisis de los datos moleculares por el método de UPGMA. En el dendograma de la Fig. 3 obtenido al usar el método de UPGMA, se observa que los grupos se forman a una menor distancia comparada con el método de Ward, en un rango de 0 a 2.7 unidades.

Se observó que las accesiones Colorada T-6, Octubreña, Fafayucan T-23, Amarillo 2289, Cardón Rojo, Octubreña T-39, Amarillo Aguado T, Sangre de Toro, Rojo 3589 T26 L, Chapeada, Alfajayucan T-16 y Pabellón T30L, mostraron una distancia euclidiana de 0. La cantidad de grupos formados, así como el número de accesiones por grupo es diferente comparado al método de Ward. Esto es, debido a que el discriminante presenta un 71.8% de la varianza entre los grupos y su correlación canónica es de 0.959 presentando un 100% acumulado en ambos. A los grupos formados no se les puede dar un nombre específico, debido a que no todas las accesiones comparten una característica fenotípica en común.

Análisis de las distancias genéticas. La matriz de datos moleculares se utilizó para la estimación de las distancias genéticas mediante la comparación de cada par de accesiones utilizando la fórmula de Nei y Li, (1979).

Los valores de las distancias genéticas alcanzaron un rango de 0 a 0.75, tomando en consideración que los valores 0 pueden ser posibles duplicados. Se analizaron estas distancias para ver si las accesiones comparadas generaron bandas en la misma posición con los marcadores utilizados y los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4.

Análisis de datos fenotípicos. Las características fenotípicas fueron evaluadas por medio de un análisis de conglomerados, utilizando los métodos de Ward y el UPGMA, y se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con RAPD.

Fig. 2 Dendrograma calculado a partir de datos moleculares de las 100 Accesiones del Banco de Germoplasma de Nopal FAUANL, usando el Método de Ward.

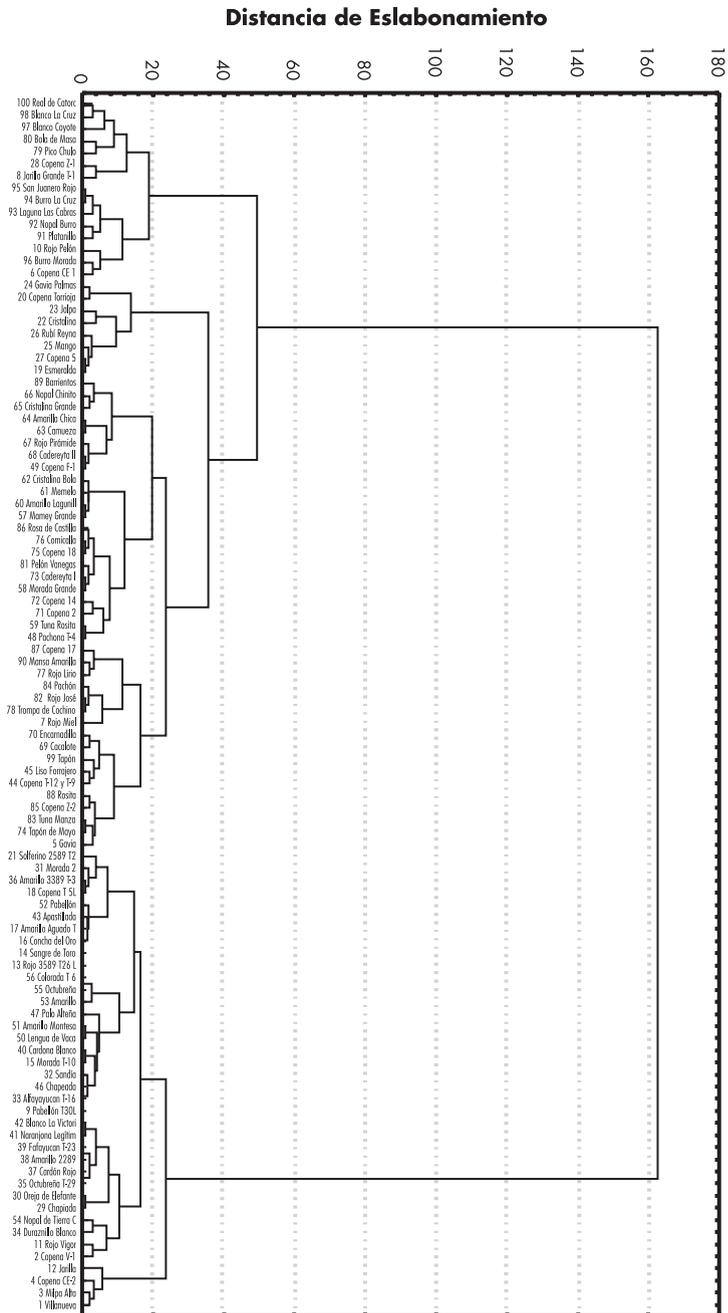


Fig. 3 Dendrograma calculado a partir de datos moleculares de las 100 Accesiones del Banco de Germoplasma de Nopal FAUANL, usando el Método de UPGMA.

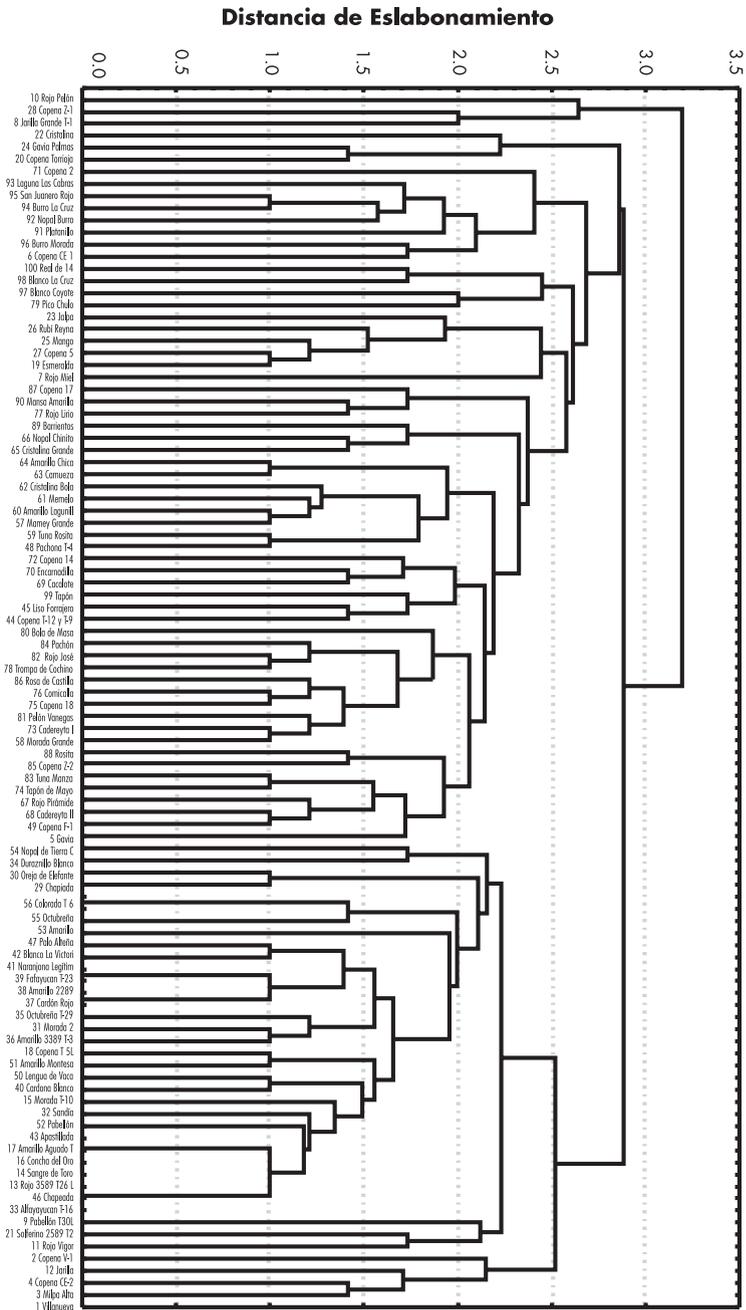


Tabla 4. Lista de accesiones duplicadas de Banco de Germoplasma de la FAUANL.	
Accesiones	Duplicados
A-9) Pabellón T30	A-33) Alfajayucan T-16, A-46) Chapeada
A-13) Rojo 3589 T26 L	A-14) Sangre de Toro, A-16) Concha de Oro, A-17) Amarillo Aguado T8
A-35) Octubreña T-39	A-37) Cardón Rojo
A-38) Amarillo 2289 T32 L	A-39) Fafayucan T-23
A-55) Octubreña	A-56) Colorada T6

Análisis de datos fenotípicos por medio del método de Ward. Las variables utilizadas para el agrupamiento fueron cuantitativas (largo, ancho, y grosor de los cladodios, altura de planta y área de cobertura) debido a que las variables cualitativas presentaron una variabilidad mínima. El método de Ward generó un dendograma en donde se formaron dos grandes grupos. El grupo compuesto por 36 accesiones tiene como característica que el uso que se le da a cada accesión es específico, es decir que sólo se dedica ya sea a producir, fruta o verdura o forraje; en cambio las 64 accesiones que forman el segundo grupo se utilizan de forma múltiple, es decir que la misma accesión tiene más de un uso.

Análisis de datos fenotípicos por el método UPGMA. En el dendograma se observó una diferencia en comparación al método de Ward, debido a que se formaron muchos grupos en un rango de 0 a 5.9 unidades de distancia euclidiana. Con referencia al grupo de 46 accesiones, se observó que todas ellas se usan para la producción de fruta. En cambio, el grupo formado por las 54 accesiones restantes tiene como característica en común que las accesiones presentan una cantidad reducida de espinas (de ninguna a intermedia), encontrándose en este grupo todas las accesiones que se dedican a la producción de verdura.

CONCLUSIONES

Los 20 marcadores utilizados detectaron la existencia de duplicados simples y múltiples. Las accesiones Octubreña T-39, Amarillo 2289 T32 L y Octubreña presentan como duplicado a Cardón Rojo, Fafayucan T-23 y Colorada T6, respectivamente, teniendo estas accesiones la característica de ser usadas para obtener fruta. En cambio la accesión Pabellón T 30 tiene como duplicado a Alfajayucan T-16 y Chapeada. La accesión Rojo 3589 T26 L presenta como duplicados a Sangre de Toro, Concha de Oro y Amarillo Aguado T8 utilizadas todas ellas para la obtención de fruta.

REFERENCIAS

- Arkley RJ, *Adv Agron* 28 (1976) 37.
- Bravo H, *Las cactáceas de México*. Universidad Autónoma de México. México, D.F. (1978) 743.
- Cenis JL, *Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas*. CIDA La Alberca Murcia (2000) 40, www.terralia.com/revista12/pagina40.htm.
- Garza GJ, *Análisis de la información mercadológica*. Ed. Alhambra Mexicana, (1995) 70.
- Granados S, DA Castañeda P, *El nopal*, Ed. Trillas, México (1996) 15.
- Hair JF, RE Anderson, RL Tatham, *Análisis multivariante*. Prentice Hall (1999) 491.
- James FC, E McCulloch, *Multivariate analysis in ecology and systematic: Panacea or Pandora's box*. *Annual Rev Ecol Syst* 21 (1990) 129.
- León J, *Información sobre bancos de germoplasma existentes en el mundo*. In T Cervantes S (Eds.), *Recursos genéticos disponibles a México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, AC Chapingo, Méx (1978) 60.
- Maréchal-Drouard L, P Guillemaut, *A powerful but simple technique to prepare polysaccharide-free DNA quickly and without phenol extraction*. *Plant Molecular Biology Reporter* 13 (1995) 26.
- Milbourne D, R Meyer, JE Bradshaw, E Baird, N Bonar, J Provan, W Powell, R Vaugh, *Comparison of PCR-based marker systems fo the analysis of genetic relationships in cultivated potato*. *Molecular Breeding* 3 (1997) 127.
- Nei M, WH Li, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76 (1979) 5269.
- Nelson RJ, *Marker-assisted plant breeding en: Persley GJ (Ed.), Biotechnology and Integrated Pest Management*. CAB international, New York, (1996).
- Ortega PR, *Nopal tunero*, T Cervantes-S (Ed.). *Recursos genéticos disponibles a México*. Sociedad Mexicana de Fitomejoramiento, AC Chapingo, México (1978) 37.
- Porebski SL, G Bailey, RB Baum, *Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. *Plant Mol Biol Repr* 12 (1997) 8.
- Rincon F, B Johnson, J Crossa, S Taba, *Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions*. *Maydica* 41 (1996) 307.
- Saldaña-A JM, *Memorias del Congreso de la Soc. Mexicana de Fitogenética*, Acapulco, México (1998) 378.
- Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, (1989) 78.
- Williams CE, D Clair, *Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum**. *Genome* 36 (1993) 619.