

# Caracterización de *Opuntia* spp. Mediante Semilla con Marcadores RAPD e ISSR y su Posible Uso para Diferenciación<sup>♦</sup>

## Characterization of *Opuntia* spp. by Means of Seed with RAPD and ISSR Markers and Its Possible Use for Differentiation

Arturo Luna-Paez<sup>1</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>1,3</sup>, Alejandro F. Barrientos-Priego<sup>1</sup>, and Clemente Gallegos-Vázquez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera. México-Texcoco. C. P. 56230, Chapingo, Edo. de México. México. Tel: 01 (595) 9521500 Ext. 6438.

<sup>2</sup>Centro Regional Universitario Centro Norte, Universidad Autónoma Chapingo, México. Apdo. Postal 196, Zacatecas, Zacatecas. C.P. 98001. México.

<sup>3</sup>Autor para correspondencia. (author to whom correspondence should be addressed). E-mail: nestty56@prodigy.net.mx

### RESUMEN

Utilizar métodos precisos para caracterizar y diferenciar plantas en los bancos de germoplasma ahorra tiempo en la selección de genotipos elite. En ocasiones esta tarea no resulta fácil, porque dependiendo de las especies, los descriptores morfológicos pueden resultar insuficientes para separar las accesiones o especies cercanas, como es el caso de algunas variedades comerciales y accesiones locales de nopal (*Opuntia* spp.) presentes en México. El uso de marcadores de ADN también se ha limitado por el exceso de polisacáridos que se obtienen simultáneamente con esta molécula, dificultando los análisis con PCR. El ADN obtenido de semilla carece de estos metabolitos; y además de la caracterización respectiva, puede aportar información relacionada con la variabilidad genética. En este estudio se caracterizaron 22 variedades de nopal con marcadores RAPD e ISSR utilizando ADN de semilla y separados en geles de poliacrilamida.. Tanto los perfiles RAPD como ISSR revelaron diferencias entre las variedades y especies consideradas. Los diferentes agrupamientos mostraron concordancia entre sí, y en su mayoría se relacionaron con los grupos taxonómicos actualmente descritos con excepción de 'Burrona' y 'Camuezo' que se ubicaron en grupos genómicos no esperados. Particularmente en 'Burrona' se detectaron polimorfismos entre plantas al usar las mezclas de semilla de cada una de ellas, a diferencia del resto de las variedades donde no se presentó tal.

**Palabras clave:** nopal, variabilidad genética, distinción interespecífica, PCR, huellas de ADN, análisis multivariado.

Abreviaciones usadas; Abbreviations used:

ADN: Acido Desoxyribonucleico ó Deoxyribonucleic Acid.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa ó Polymerase Chain Reaction

ISSR: Inter Secuencia Simple Repetida ó Inter Sequence Simple Repeat.

SSR: Secuencias Simples Repetidas ó Simple Sequence Repeats.

RAPD: DNA Polimórfico Amplificado al Azar ó Random Amplified Polymorphic DNA.

nrITS: Espacio Interno Transcrito del Núcleo Ribosomal ó Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer.

pb: Pares de bases ó bp: Base Pairs

CRUCEN: Centro Regional Universitario Centro Norte.

<sup>♦</sup> Received 19 October 2006; Accepted 9 June 2007.

## ABSTRACT

To use precise methods for characterization and to differentiate plants in the germplasm banks saves time in the selection of elite genotypes. In occasions this work is not easy, because depending on the species, the morphological descriptors can be insufficient to separate related accessions or species, like in the case of some commercial varieties and local accessions of cactus pear (*Opuntia* spp.) native of Mexico. The use of markers of DNA has also been limited by the excess of polysaccharides that are obtained simultaneously with this molecule that makes difficult the analyses with PCR. The obtained DNA of seed lacks of these compounds and besides the characterization of seeds can contribute with information related to the genetic variability. In this study 22 cactus pear varieties were characterized with markers RAPD and ISSR using DNA from seeds and were separated in polyacrylamide gels. The RAPD as ISSR profiles revealed differences between the considered varieties and species. The different clusters showed agreement to each other, and in their majority they were related with the current taxonomic groups described except for 'Burrona' and 'Camuezo' that were located in an unrelated genomic group. Particularly in 'Burrona' polymorphism was detected among the replications, contrary to the rest of the varieties that didn't show it.

**Keywords:** cactus pear, genetic variability, interspecific distinction, PCR, DNA fingerprinting, multivariate analysis.

## INTRODUCCIÓN

El nopal ha desempeñado un papel muy importante en el desarrollo de las culturas prehispánicas de México, debido a los usos en los que se le ha involucrado, considerando desde la alimentación para consumo humano hasta su utilidad en el ámbito religioso (Granados y Castañeda, 1991). Aún cuando su distribución se presenta desde Canadá hasta Argentina, en México se concentra una amplia diversidad genética, por lo que se ha considerado el centro de origen y diversificación más importante del género *Opuntia* (Bravo, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Diferentes especies de nopal han evolucionado particularmente en las zonas áridas de América donde el aprovechamiento se realizaba por recolección, para luego establecer plantaciones de tipos sobresalientes y seleccionando los ejemplares más sobresalientes favoreciendo el origen de híbridos (Granados y Castañeda, 1991; Griffith, 2004).

A la fecha se reconocen 189 especies, de las cuales 83 se localizan en nuestro país; pero se han documentado alrededor de 144 variantes nuevas con características agronómicamente apreciadas, pero que no se han clasificado por falta de descriptores morfológicos distintivos (Reyes-Agüero *et al.*, 2005). La taxonomía del género se ha reportado complicada debido a que existe una gran sinonimia y porque en la actualidad estas plantas continúan cambiando y por lo tanto en proceso de diferenciación; esto repercute en la semejanza de caracteres entre genotipos que interfieren en la separación adecuada de las especies (Bravo, 1978).

Reconociendo la importancia del nopal como recurso natural mexicano, se salvaguardan en bancos de germoplasma colecciones de valor comercial o agronómico que se describen desde un punto de vista morfológico y antropocéntrico. El fortalecimiento de la caracterización del nopal mexicano con herramientas alternativas permitirá conocer de forma más eficiente la diversidad fenética y genética existente en el país, apoyar su correcta ubicación taxonómica y en un momento dado contribuir en programas de mejoramiento genético para la creación de nuevas variedades que demanda el productor; así como el enriquecimiento de los bancos de germoplasma.

Los análisis con ADN se han utilizado con éxito en diferentes especies para los propósitos referidos, permitiendo conocer la relación genética e identificación de híbridos, entre otras variadas aplicaciones, (Nelson *et al.*, 1994). Las técnicas basadas en PCR se han preferido dada su facilidad de implementación y calidad informativa. Particularmente los RAPD se utilizan para diferenciar especies o poblaciones con variabilidad genética amplia (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002); pero para conocer el grado de parentesco genético, normalmente se recurre a marcadores conservados entre las especies tales como los SSR y algunas variantes de la técnica. Sin embargo, aun cuando los SSR tienen la capacidad de diferenciar a dos individuos de la misma especie, su implementación es costosa y solo funcionan para aquella sobre la cual se diseñaron (Moxon y Wills, 1999; Valadez y Kahl, 2000).

Como técnica alternativa a los SSR pero con diferente capacidad informativa, existen los ISSR; estos marcadores detectan regiones de ADN comprendidas entre dos microsatélites con núcleos que comparten la misma secuencia de bases. Esta técnica, al igual que los RAPD requiere de un iniciador dirigido y en posición invertida a los núcleos de dos microsatélites adyacentes, de manera que se amplifica la región comprendida entre ambos evidenciando posibles polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (ISSR). Estos polimorfismos evidencian mutaciones ocurridas en esa particular región del ADN, de manera que los individuos que se comparan tenderán a agruparse en función de esas diferencias, lo que denota cierto valor en distancia genética. Tanto las técnicas de RAPD como ISSR se han utilizado ampliamente y de manera complementaria con fines de genotipificación; y generalmente los fragmentos detectados, tienden a ser monomórficos cuando la variabilidad genética de los organismos que se comparan es reducida, por lo que se infiere mayor relación entre ellos; sin embargo, altos índices polimórficos permiten presuponer lo contrario. (Patzak, 2001; Iruela *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). Otra ventaja que han mostrado ambas técnicas es que los agrupamientos logrados con los datos moleculares generalmente han mostrando congruencia con aquellos establecidos con descriptores morfológicos (Wang *et al.*, 1998; Scarano *et al.*, 2002).

En el género *Opuntia* los análisis de ADN han sido escasos. Una de las razones principales es la presencia de mucílago asociado al ADN cuando se obtiene de cladodios aún cuando se han utilizado métodos alternativos para eliminarlo, lo que interfiere con la PCR (De la Cruz *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Mondragón-Jacobo *et al.*, 2000; Arnholdt-Schmitt *et al.*, 2001); la segunda razón, es el uso de geles de agarosa para separar los productos amplificados, lo que limita marcadamente su apreciación. Sin embargo, Mondragón-Jacobo (2003) diferenció especies de *Opuntia* utilizando RAPD y las agrupó por características comunes, además de sugerir posibles relaciones genéticas entre ellos. Wang *et al.* (1998) al comparar perfiles RAPD con datos morfológicos y fisiológicos también en accesiones de *Opuntia* spp., lograron separarlas con base en diferentes usos; pero indicaron que las diferencias entre cultivares para producción de fruta fueron muy estrechas; y de acuerdo a los estudios de cruzamiento y compatibilidad entre ellas, sugirieron reconsiderar su taxonomía.

Como alternativa y para caracterización genómica del nopal es posible utilizar ADN de semilla; en primer lugar, porque carece de mucílago y además permitiría explorar el grado de variabilidad genética intra específica y posiblemente la derivada de cruzamientos entre individuos; o bien, detectar los casos de apomixis y cleistogamia que han sido detectados en *Opuntia* (Mondragón-Jacobo y Bordelon, 20002; Pimienta, 1990). Estas características de su reproducción han sido indicadas para *O. robusta*, *O. streptacantha*, *O. cochinera*, *O. joconostle* y *O. ficus-indica*, para el caso de apomixis y con presencia de cleistogamia ha sido reconocida en *O. robusta*, *O. cochinera* y *O. ficus-indica*; mientras que especies

capaces de entrecruzarse son *O. megacantha*, *O. cochinera*, *O. robusta* y *O. streptacantha*, entre otras (Granados y Castañeda, 1991; Reyes-Agüero *et al.*, 2006).

El presente estudio se centró en la búsqueda de polimorfismos de ADN de semilla de nopal utilizando las técnicas ISSR y RAPD, con el objetivo de caracterizar 22 accesiones pertenecientes a 10 especies del género *Opuntia*, y poner a punto la extracción de ADN en semilla, para explorar la posibilidad de su uso para diferenciación. Se pretende que esta genotipificación sirva como eje de referencia para comparar y analizar molecularmente otros especímenes de interés para México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material analizado

Un total de 22 variedades de *Opuntia* fueron utilizadas en el estudio procedentes (Cuadro 1) del banco de germoplasma del CRUCEN Zacatecas, México. Dichas variedades están establecidas en sus propias raíces y para el estudio se usaron tres plantas (repeticiones) por cada variedad.

Cuadro 1. Variedades de *Opuntia* evaluadas con RAPD e SIR

Table 1. Varieties of *Opuntia* Evaluated with RAPD and ISSR

Número	Accesión	Clave <sup>1</sup>	Especie	Lugar de origen	Serie
1	‘Camuezo’	Cmz	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	Santa Rosa, Aguacalientes	Streptacanthae
2	‘Milpa Alta’	MA	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Milpa Alta, Distrito Federal	Ficus-indicae
3	‘Rojo Pelón’	RP	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	San José de Iturbide, Guanajuato	Ficus-indicae
4	‘Vaquera’	Vaq	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	El Orito, Zacatecas	Streptacanthae
5	‘Cristalina’	Cri	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	La Victoria, Pinos, Zacatecas	Streptacanthae
6	‘Mango’	Man	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	San Mateo, Valparaíso, Zacatecas	Streptacanthae
7	‘Morada T-10’	MT	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	Chapingo, Estado de México	Streptacanthae
8	‘Naranjón Legítimo’	NL	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	El Sitio, Pinos, Zacatecas	Streptacanthae

Número	Accesión	Clave <sup>1</sup>	Especie	Lugar de origen	Serie
9	‘Pico Chulo’	Pch	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	Ojo de Agua de la Palma, Zacatecas	Streptacanthae
10	‘Xoconostle Blanco’	Xbl	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	San Martín de las Pirámides, Estado de México	Streptacanthae
11	‘Xoconostle Colorado’	Xco	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	San Martín de las Pirámides, Estado de México	Streptacanthae
12	‘Xoconostle Cuaresmero’	Xcu	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	San Martín de las Pirámides, Estado de México	Streptacanthae
13	‘Burróna’	Burr	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	La Victoria, Pinos, Zacatecas	Streptacanthae
14	‘Cardona’	Car	<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	El Orito, Zacatecas	Streptacanthae
15	‘Cardona de Castilla’	CC	<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	San Mateo, Valparaíso, Zacatecas	Streptacanthae
16	‘Tapón Aguanoso’	Tag	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.	Palo Alto, El Llano, Aguascalientes	Robustae
17	‘Tapon de Mayo’	Tmy	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.	Santa Catarina, Acatzingo, Puebla	Robustae
18	‘Zaponopal Blanco’	ZNB	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.	Santa Catarina, Acatzingo, Puebla	Robustae
19	‘Charola Tardía’	Cht	<i>Opuntia hyptiacantha</i> F.A.C. Weber	El Pueblito, Pinos, Zacatecas	Streptacanthae
20	‘San Juanera’	SJ	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiff	El Terremoto, El Llano, Aguascalientes	Streptacanthae
21	‘Bolañera’	Bol	<i>Opuntia undulata</i> Griffith	Chalchisco, Jalpa, Zacatecas	Ficus-indicae
22	‘Cacalote’	Cac	<i>Opuntia cochineria</i> Griffith	Rancho Las Papas, Ojuelos, Jalisco	Robustae

<sup>1</sup>Clave referida en este estudio

### **Aislamiento de ADN**

El ADN fue extraído de la mezcla de semillas de tres frutos maduros por planta (por repetición) de la misma variedad de nopal. Las muestras se pulverizaron en un molino para café y el ADN se obtuvo con el procedimiento CTAB modificado por De la Cruz *et al.* (1997) y estandarizado para nuestras condiciones. Se utilizaron 0.3 g de la harina de las semillas, que fue homogenizada con 800  $\mu\text{l}$  del buffer de aislamiento precalentado a 60 °C [CTAB (cetil trimetil amonio bromuro) 4 % p:v, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, 0.4 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, PVP (polivinilpirrolidona) 2 %] en tubos Eppendorf. Las muestras se incubaron por 60 min a 60 °C en baño María, mezclando ocasionalmente. El DNA se extrajo adicionando un volumen proporcional (800  $\mu\text{l}$ ) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) al volumen utilizado de CTAB. Después se centrifugaron por 10 min a 5000 x g y la fase acuosa se transfirió a un tubo y se trató con RNasa 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se fenolizaron las muestras con 0.15 vol de NaCl 1.5 M, 0.7 vol de fenol equilibrado y 0.3 vol de cloroformo (respecto al volumen obtenido al recobrar la fase acuosa inmediata previa), se mezcló y se centrifugó por 20 min a 5000 x g a 4 °C. Cuando fue necesario se volvió a extraer con 1 vol de cloroformo, proporcional al volumen, obtenido después de fenolizar. El sobrenadante se transfirió nuevamente a otro tubo y se adicionó 0.6 vol de isopropanol frío con respecto al sobrenadante recuperado. Se precipitó el ADN toda la noche a -20 °C y posteriormente se recolectó por centrifugación (10 min a 8000 x g, 4 °C). El ADN condensado se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de solución de lavado (etanol 76 % y acetato de amonio 10 mM) y se recolectó por centrifugación (10 min, 5000 x g, 4 °C). Finalmente el contenido de DNA se secó por inversión del tubo y se resuspendió en 60  $\mu\text{l}$  de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8). Se almacenó a 4 °C.

La cuantificación del ADN se realizó con espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda Bio (Perkin Elmer), y su calidad se estimó en geles de agarosa 1 % en amortiguador TAE 1X (Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0). El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y se documentó en un transilluminator Dual Intensity UVP de luz UV TS-20 con el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

### **Amplificación de PCR y electroforesis**

Los análisis RAPD se realizaron con cinco iniciadores de la serie K (Carl Roth GMBH + Co) que detectaron huellas genómicas informativas (Cuadro 2), aunque previamente se habían evaluado las series A, C, E, H, y L (120 secuencias), pero sin lograr información suficiente para los objetivos del estudio. La mezcla de reacción de PCR fue de 25  $\mu\text{l}$  y contenía agua bidestilada, dNTPs 500  $\mu\text{M}$ , amortiguador Taq 1X,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, iniciador 10 pmol, ADN Taq-polimerasa (Promega) 1.5 U y DNA molde 100 ng. Las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 2.5 min. El paso de alineamiento se realizó a 40 °C, porque la temperatura es un factor que puede afectar la reproducibilidad de resultados en experimentos entre laboratorios, dependiendo del iniciador (Valadez y Kahl, 2000).

Los análisis ISSR se realizaron con cinco iniciadores anclados (Cuadro 2) de SIGMA Co., aunque previamente también se habían evaluado otras cinco secuencias: tres ancladas BDB(CA)<sub>7</sub>, (GACA)<sub>4</sub>GT y (TCC)<sub>5</sub>RY, cuyas anclas corresponden a BDB (B= G+T+C y D= G+A+T) y RY (R= A+G y Y=C+T) y dos sin ancla (GACA)<sub>4</sub>, (GGAT)<sub>4</sub>, pero cuyos productos resultaron poco informativos. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para RAPD, excepto que se utilizaron 50 ng de DNA molde. El termociclaje utilizado consistió de 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 48 °C por 30 s para el iniciador (CA)<sub>8</sub> RT y 56 °C para el resto de los iniciadores; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida (29:1) 8 % (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando 2.0  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción con 6  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga con formamida. Como

referencia se utilizó el marcador GeneRuler de 1 kb DNA Ladder de MBI Fermentas. Los geles se corrieron a 280 voltios aproximadamente por 2.5 h en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con  $\text{AgNO}_3$  0.2 % de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000). Para la documentación de las huellas de ADN se utilizó el sistema Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

### **Análisis estadístico**

Cada banda RAPD o ISSR fue considerada como un carácter o locus independiente, se codificaron visualmente como polimórficas ausentes ("0") o presentes ("1") en cada uno de los genotipos. Las diferencias cualitativas entre bandas no se consideraron. Se realizaron tres repeticiones independientes incluyendo desde las reacciones de PCR, y solo aquellas bandas consistentes se utilizaron para los análisis respectivos. La matriz básica de datos se generó con la información molecular de cada método; pero además, se realizó un análisis conjunto de combinando ambos grupos de datos (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Patzak, 2001). La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de Jaccard y para el agrupamiento se utilizó el método Neighbor-joining recomendado para generar grupos por similitud (Saitu y Nei, 1987). Para elaborar el árbol se utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50, considerando el método de remuestreo ("bootstrapping") con 1000 repeticiones, obteniendo el árbol consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.*, 2001), para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

Se realizó un análisis factorial de correspondencias simples mediante la distancia de  $X^2$ , que es uno de los métodos que describen el comportamiento de un conjunto de datos respecto a una serie de variables mediante la representación gráfica de los individuos en un espacio, considerando la menor cantidad (2-3) de las "n" variables. Una ventaja de este tipo de análisis, es que parte de la definición de proximidades y no considera *a priori* la pertenencia a grupos (Segura, 2003); además de que es posible obtener la varianza acumulada atribuida a los factores o variables obtenidos con los marcadores RAPD e ISSR, para esto se utilizó el programa NTSYSpc versión 2.10p (Applied Biostatistics, Inc.).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El ADN obtenido de semilla de nopal con las modificaciones referidas en el protocolo de extracción resultó en cantidad suficiente y con calidad óptima para los análisis de PCR; al parecer, el incremento de la concentración del CTAB y la adición de PVP en el amortiguador de extracción, favorecieron a una mejor lisis de las células, así como la prevención de la posible oxidación que se pudiera presentar en las mismas (Handa *et al.*, 2005).

Los iniciadores seleccionados para los análisis tipo RAPD e ISSR mostraron perfiles informativos y claros. Ambos tipos de perfiles de ADN diferenciaron las 22 variedades de *Opuntia* consideradas (Figura 1), por lo que su utilidad para estimación de variabilidad inter e intra específica en las diferentes especies de nopal fue exitosa, tal como lo refieren estudios realizados con las mismas técnicas en otras especies (Nagaoka y Ogiara, 1997; Huang y Sun, 2000). Los fragmentos de ADN útiles considerados para los análisis estadísticos fueron 317, cuyos pesos moleculares oscilaron entre 250 pb a 3500 pb (Cuadro 2). Con estos datos y el método de agrupamiento utilizado se separaron tanto las accesiones como las especies, que mantuvieron general concordancia con la clasificación taxonómica actual (Reyes-Agüero *et al.*, 2005) a excepción de las variedades Burrón y Camuezo, que aún cuando actualmente están clasificadas como *O. albicarpa* y *O. megacantha*, respectivamente, en nuestro estudio se relacionaron con el grupo de *O. streptacantha* en ambos análisis moleculares (Figura 1). En los pocos reportes disponibles para algunas especies de nopal utilizando ADN, particularmente RAPD, se ha propuesto realizar una reclasificación porque las distancias genéticas estimadas han sido mínimas (Wang *et al.*, 1998). Por otra parte, también se ha reportado la intergradación de caracteres al realizar cruza dirigidas, tal como lo sugirió Barrientos *et al.* (1993) donde al realizar cruzamientos intra-específicos de *O. amyclaea* Tenore

(actualmente *O. albicarpa* Schienvar) la progenie que se obtuvo presentó segregación de características propias de *O. megacantha*, *O. ficus-indica* y *O. streptacantha*, lo que supuso que marcaba el origen híbrido inter-específico de los progenitores y que pudieron haber participado en la evolución de *O. amyclaea* Tenore. Este comportamiento ha dado elementos para que los taxónomos consideren que las cactáceas continúan en un proceso activo de cambio y diferenciación, lo que dificulta a la fecha la delimitación tanto de especies como de géneros dentro de la familia (Granados y Castañeda 1991).

Cuadro 2. Iniciadores RAPD e ISSR utilizados para el análisis de genotipos de *Opuntia* spp.

Table 2. RAPD e ISSR primers used for the analysis of *Opuntia* spp. genotypes

Sistema	Iniciador	Secuencia	Fragmentos de ADN detectados	Fragmentos de ADN polimórficos
RAPD	K01 <sup>1</sup>	5'-CAT TCG AGC C-3'	25	20
	K04	5'-CCG CCC AAA C-3'	31	16
	K07	5'-AGC GAG CAA G-3'	35	15
	K-12	5'-TGG CCC TCA C-3'	33	27
	K17	5'-CCC AGC TGT G-3'	26	12
ISSR	IS01 <sup>2</sup>	5'-AC(GACA) <sub>4</sub> -3'	37	13
	IS02	5'-(AC) <sub>8</sub> YG-3'	30	13
	IS03	5'-(AGAC) <sub>4</sub> GC-3'	32	6
	IS05	5'-(CA) <sub>8</sub> RT-3'	34	15
	IS06	5'-(GA) <sub>8</sub> YC-3'	34	23

<sup>1</sup> Productos de Carl Roth Co.

<sup>2</sup> Productos de SIGMA Co. Y sustituye residuos C (citosina) y T (timina); R sustituye G (guanina) y A (adenina).



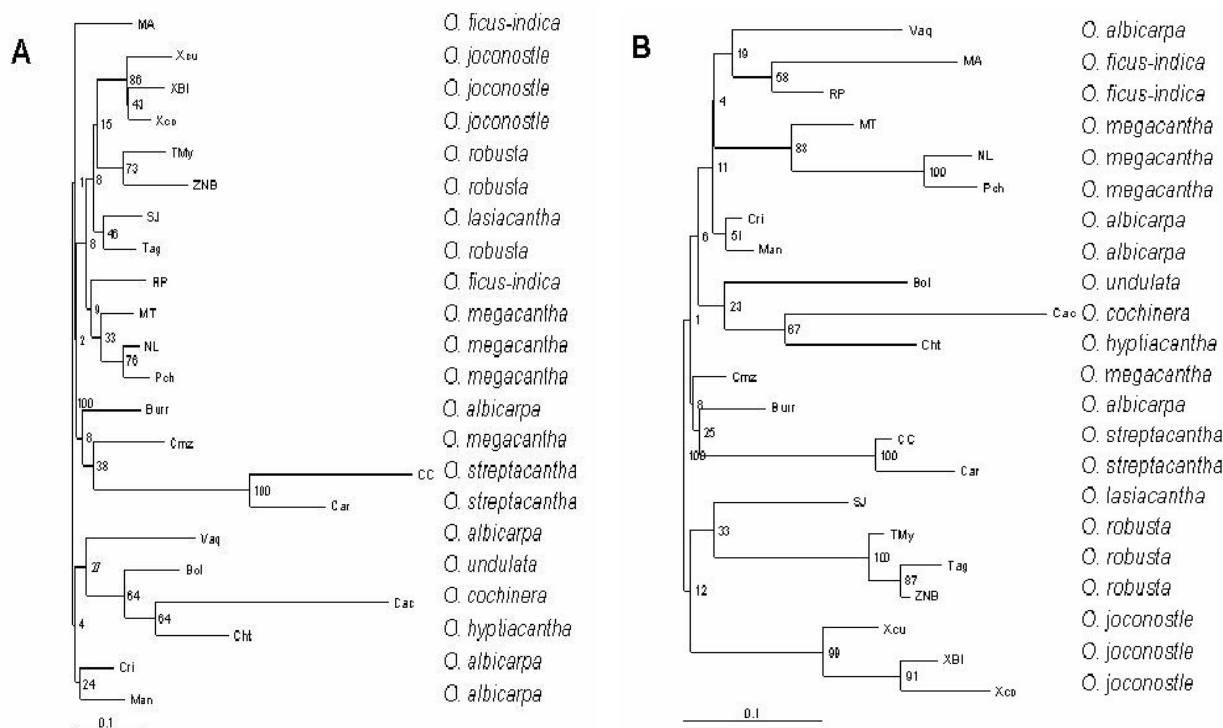


Figura 1. Árboles consenso conformado con datos RAPD (A) y datos ISSR (B) de 22 variedades de nopal (*Opuntia* spp.). Ambos agrupamientos se realizaron con el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos.

Figure 1. Consensus trees constructed with RAPD (A) y ISSR (B) data of 22 cactus pear (*Opuntia* spp.) varieties. Both clusters were made using the Jaccard coefficient and the Neighbor-Joining method with a 1000 bootstrap.

Los árboles conformados con los datos RAPD e ISSR proporcionaron información similar aunque ésta fue más consistente para el caso de los ISSR (Figura 1). En la Figura 1A que corresponde al agrupamiento de RAPD inicialmente se forman 2 ramas; la primera en donde ‘Milpa Alta’ se mantiene independiente aún cuando se esperaba su agrupamiento con ‘Rojo Pelón’ porque están clasificadas como *O. ficus-indica*; la segunda rama estuvo representada por ‘Vaquera’ (*O. albicarpa*), ‘Bolañera’ (*O. undulada*), ‘Cacalote’ (*O. cochinera*), ‘Charola Tardía’ (*O. hyptiacantha*) y las variedades Cristalina y Mango clasificadas como *O. albicarpa*. En un segundo nivel de ramificación se conformaron dos grupos, en el primero de ellos se encontraron dos subgrupos de ellos abarca los representantes de *O. joconostle*, *O. robusta* y *O. lasiacantha* (‘San Juanera’); en el segundo subgrupo se ubicaron a tres variedades de *O. megacantha* (‘Morada T-10’, ‘Naranjón Legítimo’ y Pico Chulo) y ‘Rojo Pelón’ (*O. ficus-indica*). El segundo grupo estuvo representado por las variedades de *O. streptacantha* (‘Cardona de Castilla’ y ‘Cardona’), así como ‘Burróna’ y ‘Camuezo’ clasificadas como *O. albicarpa* y *O. megacantha*, respectivamente. Cabe hacer notar que con este análisis las variedades representantes de *O. ficus-indica* (‘Milpa Alta’ y ‘Rojo Pelón’), así como las de *O. albicarpa* (‘Burróna’, ‘Vaquera’, ‘Cristalina’ y ‘Mango’) se ubicaron en grupos diferentes, lo que refleja alto polimorfismo entre los fragmentos que se compararon, y por lo tanto una relación genómica menor entre ellas que están clasificadas actualmente en las dos especies referidas (Reyes-Agüero, 2005). En la Figura 1B que representa el árbol conformado con datos ISSR se apreciaron grupos mejor diferenciados y más consistentes. En este árbol se conformaron también 2 ramas principales; una de ellas abarca las variedades de *O. robusta*, *O. joconostle* y *O.*

*lasiacantha*, agrupamiento que también fue consistente en RAPD. La otra rama comprende dos subgrupos, uno que mantienen juntas a ‘Camuezo’, ‘Burrona’, ‘Cardona de Castilla’ y ‘Cardona’, similar a lo que se encontró con RAPD; el segundo subgrupo que es más amplio las variedades se mantienen muy similares a lo observado en la Figura 1 A con RAPD. Cabe destacar que los agrupamientos del árbol 1B fueron conformados por fragmentos de ADN no aleatorios, por lo que tienden a ser más estables al interior de los genomas debido a que están comprendidos entre los microsátélites, de manera, que a diferencia de los RAPD, los polimorfismos detectados reflejan también relación mínima entre los individuos que se comparan y viceversa.

El comportamiento genómico que mostraron con ISSR las variedades Burrona y Camuezo sugiere que deben compartir ciertos rasgos fenotípicos comunes a pesar de que son especies diferentes; tal como se ha observado en agrupamientos con morfología de semillas (Guerrero-Muñoz *et al.*, 2006), entre otros estudios. Otras posibles explicaciones que se podrían considerar en el comportamiento de estas variedades, es la posibilidad de recombinación genética; o bien que en el análisis de ADN se utilizaron individuos atípicos que no representan a las variedades referidas; o incluso, a un error en la clasificación en el banco de germoplasma. Todas estas inconsistencias, principalmente requieren de otros estudios que permitan detectar con más precisión las diferencias y semejanzas para una posible reclasificación, tal como se ha sugerido para otros representantes de *Opuntia* (Wang *et al.*, 1998).

Integrando los datos moleculares de RAPD e ISSR se construyó un solo árbol (Figura 2) donde los agrupamientos fueron muy similares a los mostrados en la Figura 1. Utilizando la combinación de los caracteres fue posible percibir en este árbol dos ramas principales (A y B) en donde las variedades de nopal consideradas en nuestro estudio, se distribuyeron en lo general por el grado de domesticación. En el grupo A se ubicaron variedades cultivadas tales como ‘Burrona’ y ‘Camuezo’ y variedades poco domesticadas. En el grupo B se ubicaron especies consideradas como silvestres (*O. lasiacantha* y *O. robusta*), además de los xoconostles, pero también representantes de *O. megacantha*, que se caracterizan por tener mayor grado de domesticación. Respecto al grado de relación de similitud entre las variedades, las del grupo B es más estrecha dada la distancia respecto al origen del árbol; por ejemplo, ‘Naranjón Legítimo’ y ‘Pico Chulo’ que pertenecen a *O. megacantha* mantienen la menor distancia genética (0.06429); mientras que en el grupo A, la relación se muestra más alejada; por ejemplo, ‘Cacalote’ y ‘Cardona’, clasificadas en especies diferentes (*O. cochineria* y *O. streptacantha*, respectivamente) presentaron la mayor distancia genética (0.66216). Este comportamiento entre las variedades de nopal en estudio, se consideró lo suficientemente sólido con base en el análisis aplicado de remuestreo (“bootstrapping”). Debido a que con la comparación de huellas de ADN no nos fue posible ubicar algunas de las variedades en la supuesta especie a la que pertenecen, se hace necesario recurrir a otras alternativas de análisis molecular para obtener mejores elementos que nos conlleven a apoyar su taxonomía y estimar si la gama de variedades utilizadas en este estudio, realmente pertenecen a diferentes especies o solamente son variantes intra-específicas. Varios investigadores ya han sugerido esta posibilidad (Kiesling, 1999; Labra *et al.*, 2003), y nuestros análisis moleculares concuerdan también con estas observaciones, lo cual se deduce del comportamiento de los agrupamientos. Con la finalidad de contrastar información genética utilizada para fines taxonómicos, se secuenciaron las dos regiones ITS y el gen 5.8 S de las variedades Cardón de Castilla y Pico Chulo que pertenecen a *O. streptacantha* y *O. megacantha*, respectivamente, e incluidos es este estudio; así como las variedades ‘Fafayuca’ y ‘Amarilla Oro’ clasificadas como *O. albicarpa*. La secuencia de DNA de estos genotipos resultó ser la misma (accesiones números DQ672548, DQ672551, DQ672549 y DQ672550 del GeneBank). Esta evidencia sugiere que estas tres especies diferentes consideradas a la fecha, realmente pudieran pertenecer a una misma especie, a reserva de secuenciar otros genes conservados y disponer de más elementos filogenéticos, algo similar también encontró Griffith (2004) al analizar secuencias de ADN nrITS donde concluye que el concepto taxonómico de *O. ficus-indica* puede incluir clones derivados de linajes múltiples y por lo tanto ser polifilético, donde encontró poca variación en la región ITS entre *O. ficus-indica*, *O. leucotricha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha*, y *O. streptacantha*.

La relación que han mostrado en nuestros análisis ‘Burróna’ (*O. albicarpa*) y ‘Camuezo’ (*O. megacantha*) sugiere considerar la posibilidad de entrecruzamiento entre especies del género *Opuntia* (Pimienta-Barrios 1995; Reyes-Aguero *et al.*, 2006) o como se indicó con anterioridad su reclasificación.

El resultado del análisis de correspondencias simples (Figura 3) basado en las distancia de  $X^2$  permitió observar las tendencias de los individuos respecto a la serie de variables consideradas. Además, permitió analizar la contribución de factores a la varianza, manifestando que el 54.79 % se puede explicar con los primeros cuatro factores (Cuadro 3). Además se aprecia la asociación de las variedades y los vectores que generaron a cada grupo. Esta representación tridimensional revela la concordancia, con el árbol de consenso (Figura 2), donde se mantienen los agrupamientos por especie y la generación de un grupo para las variedades con un solo ejemplar que representan especies diferentes pero con cierto grado de asociación. También se guarda la asociación de ‘San Juanera’ con *O. robusta* y se advierte el agrupamiento de las accesiones de *O. albicarpa* y *O. ficus-indica* en el origen de los vectores, señalando el grado de similitud entre estas dos especies.

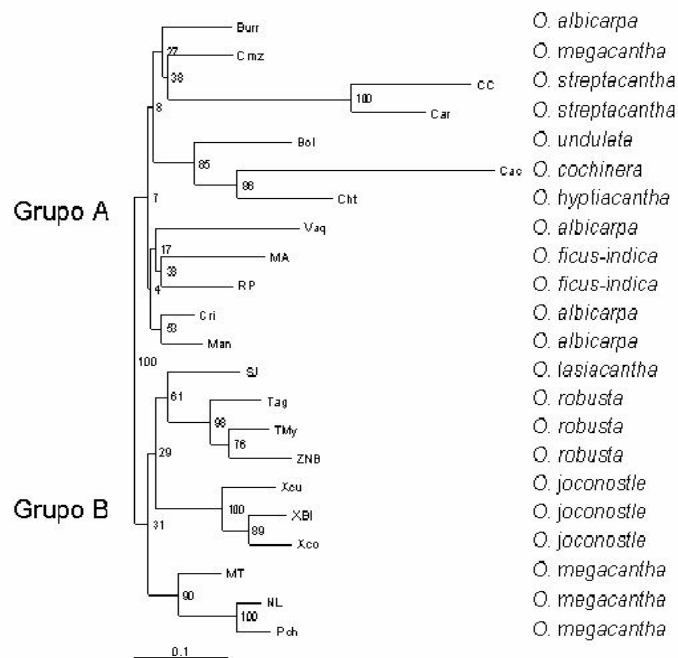


Figura 2. Árbol consenso obtenido a partir de los datos RAPD e ISSR de 22 variedades de *Opuntia*. Utilizando el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos.

Figure 2. Consensus trees constructed with RAPD and ISSR data of 22 *Opuntia* spp. varieties. Using the Jaccard coefficient and the Neighbor-Joining method with a 1000 bootstrap.

Estos dos grupos formados en el árbol de consenso (Figura 2), no coincide con la subdivisión del género en lo que se refiere a las series Streptacanthae y Robustae (Segura *et al.*, 2007), ya que en Robustae se encuentra la especie *O. robusta* Wendland ex Pfeiff. con sus respectivas subespecies y variedades botánicas, debido a que en el grupo B obtenido a parte de *O. robusta* también se asocia *O. lasiacantha*, *O. joconostle*, *O. megacantha*, que son de la serie Streptacanthae. Mientras que en el grupo A están especies de la serie Streptacanthae y faltando *O. lasiacantha*, *O. joconostle* y *O. megacantha*. Todas la especies estudiadas aparentemente son octoploides (8x), con excepción de *O. robusta* que puede tener individuos

tetraploide (4x) (Segura *et al.*, 2007) y diploides (2x) (Barrientos *et al.*, 1993), sin embargo, no podemos asegurar más al respecto por no conocer la ploidía de cada accesión estudiada.

Cuadro 3. Eigenvalores y la contribución en porcentaje derivado del análisis de correspondencia de 22 accesiones de *Opuntia* spp., utilizando marcadores RAPD e ISSR.

Table 3. Eigenvalues and the percentage of contribution derived from the correspondence analysis of 22 accessions of *Opuntia* spp., using RAPD and ISSR markers.

	<b>Eigenvalor</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Porcentaje acumulado (%)</b>
1	0.0390	18.49	18.49
2	0.0360	17.07	35.55
3	0.0232	10.99	46.54
4	0.0174	8.24	54.79
5	0.0158	7.52	62.30
6	0.0125	5.94	68.24
7	0.0085	4.06	72.30
8	0.0076	3.59	75.89
9	0.0074	3.50	79.39
10	0.0065	3.10	82.49
11	0.0063	3.00	85.49
12	0.0049	2.31	87.81
13	0.0044	2.08	89.89
14	0.0038	1.81	91.69
15	0.0035	1.65	93.34
16	0.0033	1.58	94.92
17	0.0030	1.43	96.35
18	0.0027	1.26	97.61
19	0.0020	0.96	98.58
20	0.0016	0.77	99.35
21	0.0014	0.65	100.00

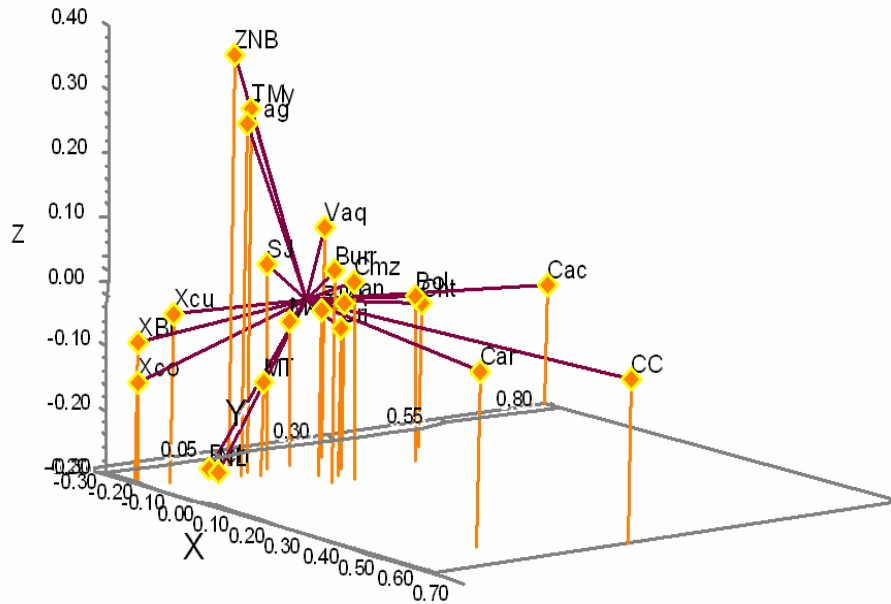


Figura 3. Proyección de 22 accesiones de *Opuntia* generado con tres factores obtenido por análisis de correspondencias simples, utilizando marcadores RAPD e ISSR.

Figure 3. Projection of 22 *Opuntia* accessions generated with the three factors resulting from the simple correspondence analysis, using RAPD and ISSR markers.

Otro resultado interesante derivado de los análisis con ADN de semillas fue la posibilidad de detectar polimorfismos de ADN entre repeticiones solamente en 'Burróna' que pueden referir re-arreglos en el ADN provocados posiblemente por recombinación genética o efectos de mutación; sobre todo si se considera que esta variedad presenta poliploidía (Pimienta, 1990). En la Figura 4 se muestran los perfiles de ADN de las tres repeticiones independientes de las muestras de semilla analizadas (A, B y C: son repeticiones).

En este mismo sentido, y dado que se detectó alta similitud en las huellas genómicas entre las repeticiones del resto de las variedades estudiadas, sugiere que el ADN proveniente de semilla no necesariamente es resultado de recombinación genética, sino que pudo tener su origen en los fenómenos de cleistogamia lo cual puede derivar en homocigosis, o a partir de embriones asexuales generados por apomixis (Mondragón-Jacobo y Bordelon, 2002; Modragón-Jacobo, 2004).

Dado los resultados obtenidos en la mayoría de los casos existe la posibilidad de la utilización de las semillas para ser utilizado en análisis de ADN con fines de distinción de las variedades estudiadas. Sin embargo, para tener una mayor certeza en cuanto a las agrupaciones obtenidas se deben de ratificar con mayor número de individuos de las especies estudiadas.

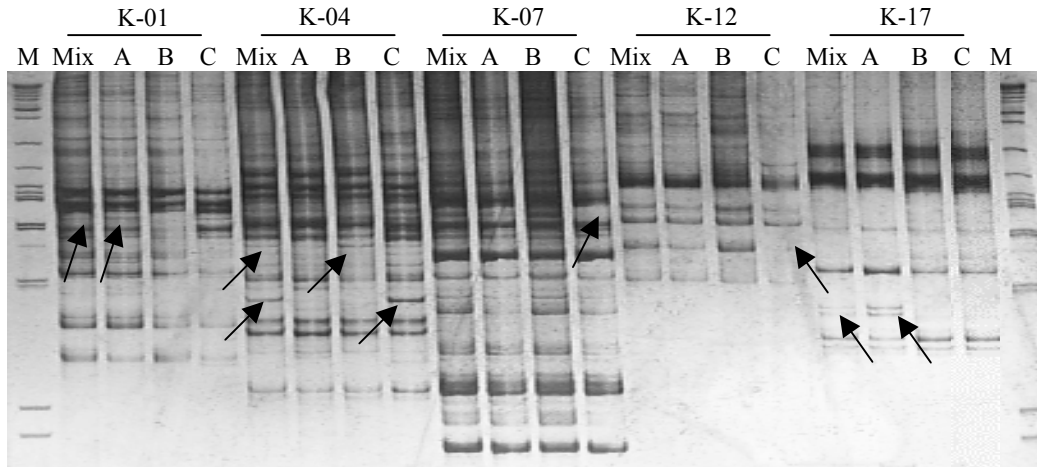


Figura 4. Perfiles RAPD detectados con 5 iniciadores en la variedad Burrona (*Opuntia albicarpa* Scheinvar). Repeticiones A, B y C de semillas de cada planta. (Mix: mezcla de semillas de las tres plantas A, B y C). Carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb. Las flechas señalan algunos polimorfismos detectados entre repeticiones.

Figure 4. RAPD profiles detected with 5 primers in the variety Burrona (*Opuntia albicarpa* Scheinvar). Replications A, B and C of seed of each plant. (Mix: seed mix of the three plants A, B and C). Lane M corresponds to a molecular weight marker of 1 kb. The arrows show some polymorphism detected between replications.

## CONCLUSIONES

La utilización de semilla para realizar análisis genéticos en nopal permitió detectar perfiles de ADN reproducibles y nítidos.

Los perfiles de ADN detectados con RAPD e ISSR permitieron diferenciar las 22 accesiones de nopal consideradas en este estudio, de la misma forma que lo han logrado los caracteres morfológicos; así como observar la relación genómica entre las especies, con la excepción de 'Burróna' y 'Camuezo'.

Las técnicas RAPD e ISSR combinadas permiten separar en su mayoría las accesiones cultivadas de las poco domesticadas y las silvestres.

Los análisis con ADN aportan información valiosa para relacionar a especies de *Opuntia*, además de que complementa la caracterización realizada con otros tipos de variable.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a SAGARPA-SNICS por el apoyo brindado al proyecto 127 de Red Nopal del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) y al CONACYT por la beca otorgada con registro 152909 para realizar estudios de posgrado del primer autor.

## LITERATURA CITADA

- Arnholdt-Schmitt, B., G. L. Coe, R. M. Llamoca-Zárata and A. P. F. Campos. 2001. Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and efficient micromethod. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 4:57-65.
- Barrientos-Pérez, F., A. Muratalla-Lua and A. F. Barrientos-Priego. 1993. New hybrids of *Opuntia*, chapter 18. pp. 243-251. In: *Biotechnology for Aridland Plants*. IC2 Institute The University of Texas at Austin. Austin, TX, USA.
- Bravo H., E. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F., México. 743 p.
- Bravo-Hollis, H. and L.Scheinvar. 1999. *El Interesante Mundo de las Cactáceas*. 2da edición. Fondo de Cultura Económica. D. F., México. 233 p.
- De la Cruz, M., F. Ramírez and H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplified from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:319-325.
- Fernández, M., A. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104(5):845-851.
- Granados S., A. and A. D. Castañeda P. 1991. *El Nopal. Historia, Fisiología, Genética e Importancia Frutícola*. Editorial Trillas. D. F., México. 227 p.
- Griffith, P. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (*Cactaceae*): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1911-1921.
- Guerrero-Muñoz, P., H. A. Zavaleta-Mancera, A. F. Barrientos-Priego, C. Gallegos-Vázquez, C. A. Nuñez-Colín and E. Valadez-Moctezuma, J. A. Cuevas-Sánchez. 2006. Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2):37-43.
- Handa, L., B. P. de T. Sampaio and R. C. Quisen. 2005. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica* 35(1):29-33.
- Huang, J. C. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 100(7):1050-1060.
- Iruela, M., J. Rubio, J. I. Cubero, J. Gil and T. Millán. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104(4):643-651.
- Kiesling, R. 1999. Domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3:50-59.
- Labra, M., F. Grassi, M. Bardini, S. Imazio, A. Guiggi, S. Citterrop, E. Banfi, and S. Sgorbati. 2003. Genetic relationships in *Opuntia* Mill. genus (*Cactaceae*) detected by molecular marker. *Plant Science* 165:1129-1136.

- Martins, M., R. Tenreiro and M. M. Oliveira. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 22(1):71-78.
- Mondragón-Jacobo, C. 2003. Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(1):97-114.
- Mondragón-Jacobo, C. 2004. Mejoramiento genético del nopal: Avances al 2003 y perspectivas, pp. 49-71. *In: El Nopal: Tópicos de Actualidad*. Esparza-Frausto, G.; Valdez-Cepeda, R. D.; Méndez-Gallegos, S. J. (eds.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Mondragón-Jacobo, C. and B. Bordelon. 2002. Presencia de apomixis en cruces de nopales mexicanos y su identificación molecular preliminar. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(3):247-252.
- Mondragón-Jacobo, C., N. Doudareva and B. Bordelon, 2000. DNA extraction from several cacti. *HortScience* 35(6):1121-1126.
- Moxon, R. and C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: Agents of evolution?. *Scientific American* 280(1):72-77.
- Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5):597-602.
- Nelson, R. J., M. R. Baraoidan, C. C. M. Vera, I. V. Yap, J. E. Leach, T. W. Mew and H. Nyboon. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3275-3283.
- Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121(1):9-18.
- Pimienta Barrios, E. 1990. *El Nopal Tunero*. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 246 p.
- Pimienta-Barrios, E. and A. Muñoz-Urias. 1995. Domestication of Opuntias and cultivated varieties, pp. 58-61. *In: Barbera, G.; Inlgese, P.; Pimienta-Barrios, E. (eds.). Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*. International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. FAO publications. Rome, Italy.
- Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath, 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44(5): 763-772.
- Reyes-Agüero, J. A., J. R. Aguirre R., and J. L. Flores F. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia* 30(8):476-484.
- Reyes-Agüero, J. A., J. R. Aguirre R., A. Valiente-Banuet, 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* 64:549-585.



- Saitu, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Gel electrophoresis of DNA. pp. 6.0-6.62. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol I. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scarano, M. T., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and N. Tusa. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Reports* 20(12): 1162-1166.
- Segura L., S., L. Scheinvar, G. Olalde, S. Leblanc, S. Filardo, A. Muratalla, C. Gallegos, and C. Flores. 2007. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. Series *Stretacanthae* Britton *et* Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravonae* Schienvar and *Robustae* Britton *et* Rose. *Genetic Resources and Crop Evolution* (in press).
- Segura L., S. D. 2003. Diversidad morfológica interespecífica del subgénero *Tacsonia* (*Passiflora*), pp. 79-84. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. (eds.) Franco, T. L. e Hidalgo, R.. Boletín Técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia.
- Valadez, E. and G. Kahl. 2000. Huellas Genómicas de ADN de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. D. F., México. 147 p.
- Vladimir, H., A. Pavlícek and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:731-735.
- Wang, X., P. Felker, D. M. Burow and H. A. Paterson. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3:3-14.