

OPTIMIZACIÓN DE LAS HUELLAS DE DNA OBTENIDAS CON RAPDS Y MP-PCR MEDIANTE LA TÉCNICA RAMPNR

E. Valadez-Moctezuma¹; G. Kahl²; A. Rubluo-Islas^{3†}; R. Arreguín-de los Monteros³

¹Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: evaladez@correo.chapingo.mx ([†]Autor responsable).

²Plant Molecular Biology Biocentre. Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main. GERMANY. Correo-e: kahl@em.uni-frankfurt.de

³Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. D. F. MÉXICO. Correo-e: arrestin@servidor.unam.mx

RESUMEN

Analizar DNA con PCR ha sido una estrategia de rutina desde la década de los años noventa y se ha utilizado ampliamente con diferentes propósitos, entre ellos en la caracterización, diferenciación e identificación de organismos. La técnica más utilizada es la de RAPDs, pero su reproducibilidad se ha cuestionado entre laboratorios. En el presente trabajo se demuestra el potencial de una técnica no radioactiva basada en PCR que utiliza iniciadores aleatorios y de microsatélites en la misma reacción denominada RAMPnr-PCR (RAMP-PCR no radioactiva), adecuada para fines de genotipificación de plantas. Esta técnica se evaluó en diferentes especies de leguminosas (*Cicer arietinum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Arachis hypogaea* L., *Medicago sativa* L., *Lens esculenta* Moench, *Vicia faba* L., *Glycine max* L., *Pisum sativum* L. y *Tamarindus indica* L.) mostrando patrones más informativos respecto a los obtenidos independiente con RAPDs y MP-PCR. Los productos de RAMPnr se separaron en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio. Algunas de las ventajas que la técnica ofrece son mayor estabilidad y cantidad de huellas detectadas, no requiere marcaje y el costo es equivalente al de las técnicas mencionadas; por lo que RAMPnr-PCR podría ser de gran utilidad en la tipificación de genomas, así como en la búsqueda de marcadores genéticos asociados a características específicas.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: marcadores moleculares, PCR, genotipificación.

OPTIMIZATION OF DNA FINGERPRINTS OBTAINED WITH RAPD AND MP-PCR BY THE RAMPNR TECHNIQUE

ABSTRACT

PCR-based analysis of DNA has been a routine strategy since the 1990s; it has been widely used for several purposes, among these characterization, differentiation and identification of organisms. The RAPD technique is the most common; however its reproducibility has been questioned among laboratories. In this study, the potential of a non-radioactive technique for genotyping that uses both random and microsatellite primers in the same PCR reaction, called RAMPnr-PCR (non-radioactive RAMP-PCR), is reported. This technique was evaluated with different species of legumes (*Cicer arietinum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Arachis hypogaea* L., *Medicago sativa* L., *Lens esculenta* Moench, *Vicia faba* L., *Glycine max* L., *Pisum sativum* L. y *Tamarindus indica* L.). DNA profiles exhibited were more informative than those obtained independently with RAPDs and MP-PCR. RAMPnr-PCR has several advantages: it is more stability and produces a higher number of DNA fingerprints, marking is not required and cost is equivalent to that of RAPDs or MP-PCR techniques. For those reasons, RAMPnr-PCR can be of great use in typification of genomes as well as in the search for molecular markers related to specific traits.

ADDITIONAL KEY WORDS: molecular markers, PCR, genotyping.

INTRODUCCIÓN

La genotipificación es una tecnología utilizada desde la década de los años ochenta con muy amplias aplicaciones (Caetano-Anollés, 2001). De manera práctica se ha empleado en la caracterización de variedades

comerciales para protección de derechos de obtentor y patentes; para control de la calidad en la producción y procesamiento de plantas, para establecer relaciones genéticas y evolutivas y, especialmente en el fitomejoramiento, se utiliza para confirmar la identidad de

los progenitores y progenie en poblaciones mejoradas mediante selección asistida por marcadores (Yang *et al.*, 1996; Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001). Sin embargo, su aplicación de forma rutinaria en diferentes laboratorios puede requerir del uso estandarizado de protocolos para reproducir los resultados. Esto es especialmente importante en la comparación de colecciones de germoplasma cuya finalidad es apoyar la conservación y explotación de los recursos genéticos (Winter y Kahl, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

Estudios similares se han realizado en algunos patógenos de plantas, ya que la estimación de su variabilidad genética junto con pruebas de patogenicidad, proveen las bases para la detección anual de cambios en su distribución, lo que es de utilidad para diagnosticar y prevenir epidemias futuras (Kaemer *et al.*, 1992).

La tecnología de PCR ha sido una de las herramientas moleculares más utilizada para los propósitos citados, pero también para aislar genes específicos, detectar alelos (Hoelzel, 1992); e incluso, para el estudio de relaciones genéticas de especies fosilizadas o momificadas (Pääbo, 1989; Al-Zahim *et al.*, 1997; Pejic *et al.*, 1998). Los estudios de relación genética con técnicas moleculares se basan en el principio de que los fragmentos de DNA que se comparan en el mismo sistema electroforético y que muestren el mismo peso molecular tienen el mismo origen, siempre y cuando se hayan obtenido con las mismas técnicas. Diferentes protocolos se han diseñado para revelar esas similitudes o diferencias genómicas, pero su sensibilidad para la detección es diferente (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2001).

Una de las técnicas más populares de PCR es la de **RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)** que permite la síntesis de fragmentos específicos de DNA (amplicones), cuando dos iniciadores aleatorios se alinean en zonas invertidas y complementarias en el genoma (Caetano-Anollés, 2001). Sin embargo, su reproducibilidad entre laboratorios se ha cuestionado por causa de factores variables; por ejemplo, la variación de temperaturas durante el termociclaje ocasionada por los diferentes tipos de termocicladores, la marca y concentración de los reactivos utilizados ($MgCl_2$, DNA polimerasa, principalmente) y la calidad del DNA, principalmente (Penner *et al.*, 1993; Staub *et al.*, 1996).

La técnica **MP-PCR (Microsatellite Primed-PCR)** por sus siglas en inglés fue utilizada por vez primera por Meyer en 1993 y requiere iniciadores que complementen regiones del genoma en donde se encuentre el microsatélite correspondiente (Weising *et al.*, 1998). Este término describe la organización repetida en serie de grupos de di, tri y tetranucleótidos cuya función se desconoce hasta la fecha, pero se especula que pueden ser de tipo regulatorio (Hüttel *et al.*, 1997) y que juegan un papel importante en

los procesos de evolución (Moxon y Wills, 1999). Los microsatélites se han reportado en todos los eucariontes estudiados y la principal ventaja que ofrecen para genotipificación es su abundancia y dispersión en el DNA, lo que permite detectar variaciones informativas en regiones específicas de un *locus* particular y obtener huellas de diferente longitud; es decir, verdaderos "DNA fingerprints". Ejemplos de estas secuencias son $(GATA)_4$, $(GACA)_4$, $(TCC)_5$, $(GTG)_5$, $(GGAT)_4$, $(CT)_8$, $(CA)_8$ (Sharma *et al.*, 1997). La detección y análisis de los productos de MP-PCR se realiza de la misma forma que RAPDs, aunque es recomendable separarlos en geles de acrilamida y teñirlos con plata (Staub y Serquen, 1996; Weising *et al.*, 1998).

RAMP-PCR (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) fue una técnica propuesta por Wu *et al.*, en 1994. Utiliza iniciadores de microsatélites anclados en el extremo 5' y marcados con P^{32} , además de iniciadores aleatorios. El programa de termociclaje se diseñó en este caso para favorecer principalmente la amplificación de los microsatélites, aunque no se excluía la posibilidad de considerar bandas tipo RAPDs. Estos investigadores reportaron que la técnica detectó entre 10 y 20 polimorfismos por iniciador en geles de acrilamida y de 2 a 7 alelos en 11 ecotipos diferentes de *Arabidopsis*, lo que superaba las expectativas con otras alternativas. Posteriormente, la técnica se utilizó también con éxito por Becker y Heun (1995) y Hüttel (1997) en el cultivo de garbanzo (citados por Weising *et al.*, 1995) y por Sánchez de la Hoz *et al.* (1996) en cebada, pero en ambos casos sin radioactividad.

La modificación realizada por nosotros a esta técnica (RAMPnr) se realizó como opción para la detección de perfiles de DNA más abundantes e informativos que los obtenidos con RAPDs y MP-PCR en genotipificación de plantas, pero sin radioactividad y sin acrilamida; considerando, en primer lugar, que la reproducibilidad de los RAPDs se ha cuestionado pero no los detectados con microsatélites. La modificación consistió en que los iniciadores de microsatélites fueron sin anclas y sin marcaje (Figura 1) y los productos obtenidos se separaron en geles de agarosa convencionales y teñidos con bromuro de etidio, lo que facilita su utilización en muchos laboratorios.

Con la finalidad de evaluar el potencial de la técnica modificada, el objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad informativa de las huellas tipo RAPDs, MP-PCR y RAMPnr-PCR en nueve genotipos de diferentes especies de leguminosas de importancia económica para México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plántulas crecidas en condiciones de invernadero de las siguientes especies cultivadas: garbanzo (*Cicer arietinum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), lenteja

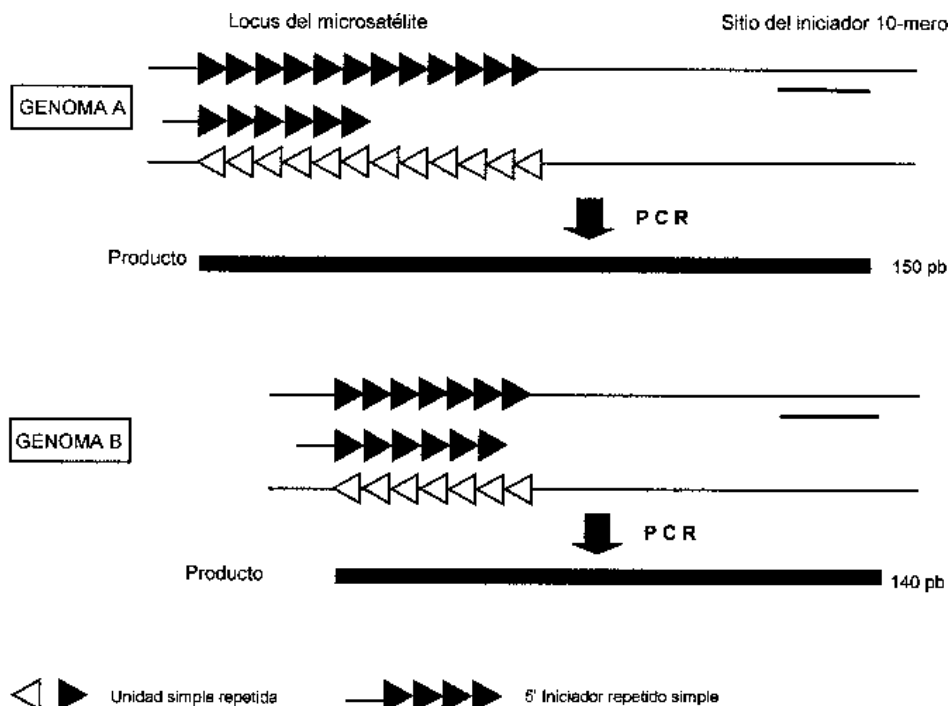


FIGURA 1. Diagrama de la técnica de RAMP-PCR no radioactiva (RAMPnr). Esta técnica permite la síntesis de cualquier región de DNA flanqueada por iniciadores aleatorios y/o de microsatélites de manera simultánea mostrando los polimorfismos en los fragmentos tipo RAPD-RAPD, RAPD-MP, MP-RAPD y MP-MP al comparar dos o más genomas. Los polimorfismos que se comparan se deben a la pérdida o ganancia de bases nitrogenadas en la secuencia particular delimitada por los iniciadores.

(*Lens esculenta* Moench), haba (*Vicia faba* L.), soya (*Glycine max* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.) y tamarindo (*Tamarindus indica* L.).

El DNA se obtuvo con el método de Dellaporta *et al.* (1983) y el RNA de las muestras se eliminó con RNasa (10 mg·ml⁻¹), finalmente el DNA se resuspendió en TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1mM). Previo a la aplicación de las técnicas, se estandarizaron las condiciones para las reacciones respectivas de PCR ajustando las cantidades de DNA, enzima DNA polimerasa y MgCl₂ principalmente. Para RAPDs se utilizaron los iniciadores aleatorios G-03 (5'-GAGCCCTCCA-3') y G-10 (5'-AGGGCCGTCT-3') de Roth Company; para microsatélites el iniciador (GATA)₄ de Gibco BRL; y para la técnica de RAMPnr, la combinación de ambos iniciadores [(GATA)₄ + G-03 y (GATA)₄ + G-10]. El programa de termociclaje para las tres técnicas fue: 1 ciclo a 94 °C 1 min; 35 ciclos [94 °C, 20 s; 40 °C, 1 min; 72 °C, 20 s] y 6 min de extensión final a 72 °C. La selección y combinación específica de los iniciadores para la implementación de RAMPnr fue definida con base en la capacidad de amplificación de los iniciadores aleatorios a la T_M óptima del microsatélite; es decir, que para combinar cada iniciador aleatorio con (GATA)₄ éstos fueran capaces de funcionar a 40° C. El éxito de la técnica radica precisamente en este aspecto, ya que aquellos iniciadores para RAPDs que funcionen con T_M mayores de 35° C (temperatura que normalmente utiliza esta técnica) garantizan especificidad y reproducibilidad en los patrones

RAMPnr. Para seleccionar los iniciadores aleatorios apropiados, se evaluaron las 20 secuencias del kit G desde 35° C a 48° C, seleccionando solamente al G-03 y G-10 para la técnica RAMP. Sin embargo, se realizaron otras combinaciones de los mismos iniciadores aleatorios con los microsatélite (GACA)₄ y (GGAT)₄ cuya T_M es de 48 °C y los perfiles RAMPnr fueron también reproducibles e informativos (datos no mostrados a excepción de la funcionalidad de los iniciadores aleatorios a esta temperatura, Figura 2). Estos resultados nos permitieron generalizar que, dependiendo del iniciador de microsatélite a utilizar será la temperatura a la cual se deben seleccionar los iniciadores para RAPDs.

Para PCR se utilizó el termociclador DNA Thermal cycler 480 de Perkin-Elmer. El volumen final de reacción fue de 25 µl con 200 mM de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 1X de amortiguador para *Taq*, 2 mM de MgCl₂, 50 ng de DNA, 20 pmoles del iniciador de microsatélite y/o 20 pmoles del iniciador aleatorio correspondiente. En todos los casos se incluyó un control negativo con todos los componentes excepto DNA. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 2.2 % con amortiguador TAE 1X (40 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM de acetato de sodio; 2 mM de EDTA) y se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg·ml⁻¹), posteriormente se documentaron y analizaron con el sistema Kodak Digital Science 1D 2.0.

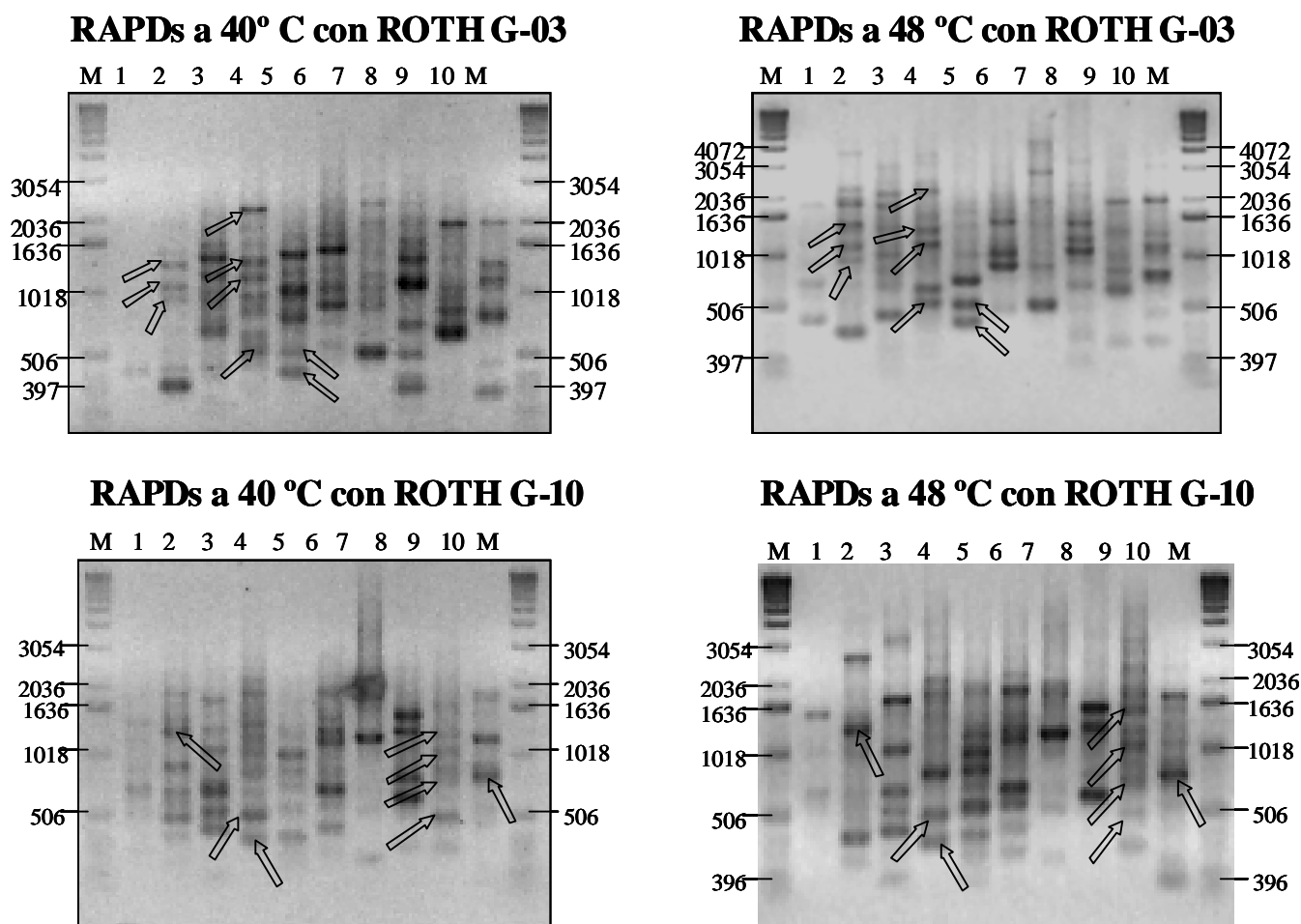


FIGURA 2. Amplificaciones RAPDs a 40 y 48 °C con los iniciadores G-03 y G-10 en diferentes leguminosas. M: marcador de peso molecular de 1 kb; 1: blanco, 2: *Cicer arietinum* L., 3: *Phaseolus vulgaris* L., 4: *Arachis hypogaea* L., 5: *Medicago sativa* L., 6: *Lens esculenta* Moench, 7: *Vicia faba* L., 8: *Glycine max* L., 9: *Pisum sativum* L., 10: *Tamarindus indica* L. Las flechas señalan algunos fragmentos conservados en ambas temperaturas. En los carriles 6 a 10 de de los RAPDs con G-03 no se indica algún fragmento en particular porque todos fueron amplificados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles RAPDs con los iniciadores G-03 y G-10 tanto a 40 °C como a 48 °C en las especies de leguminosas utilizadas se muestran en la Figura 2. Aun cuando en este estudio no se reportan perfiles RAMPnr a 48 °C, la apreciación y comparación de los perfiles RAPDs en ambas temperatura, permite estimar la funcionalidad de este tipo de secuencias para ser utilizados en la técnica que se está proponiendo. La comparación de los perfiles de DNA obtenidos con las tres técnicas se indican en las Figuras 3 y 4 (RAPDs, MP-PCR y RAMPnr) a 40 °C de alineamiento en el programa de termociclaje. En el panel A de ambas Figuras se muestran los perfiles RAPDs con los iniciadores G-03 o G-10; en el panel B, los perfiles de MP-PCR utilizando el iniciador (GATA)₄ y en el panel C, los perfiles RAMPnr, respectivamente. Nótese que los perfiles RAPDs y microsatélites en ambas Figuras son nítidos, pero en el panel C se observan perfiles nuevos que comparten algunos fragmentos (pesos moleculares similares) de los perfiles obtenidos independientemente con las técnicas citadas, así como

también polimorfismos nuevos. Las figuras del panel C respecto a las de los paneles A y B, exhiben un patrón complejo y abundante de fragmentos, que se presume contienen no sólo la expresión de aquellos amplificados con cada uno de los iniciadores involucrados, sino además, los amplicones flanqueados simultáneamente por ambos iniciadores. En otras palabras, este patrón representa potencialmente cuatro tipos de fragmentos: RAPD-RAPD; microsatélite-microsatélite; RAPD-microsatélite y microsatélite-RAPD; lo que nos permite suponer que los perfiles RAMPnr superan el potencial de RAPDs y MP-PCR.

Respecto a los barridos que se aprecian en los perfiles RAMP en el panel C de las Figuras 3 y 4, también se apreciaron con los otros microsatélites evaluados, aunque solo se muestra el resultado con (GATA)₄. Es muy probable que este barrido contenga artefactos que se manifiestan como fragmentos incompletos, lo que provoca que no se aprecien bandas definidas y nítidas; pero también cabe la posibilidad de que existan fragmentos de pesos moleculares muy cer-

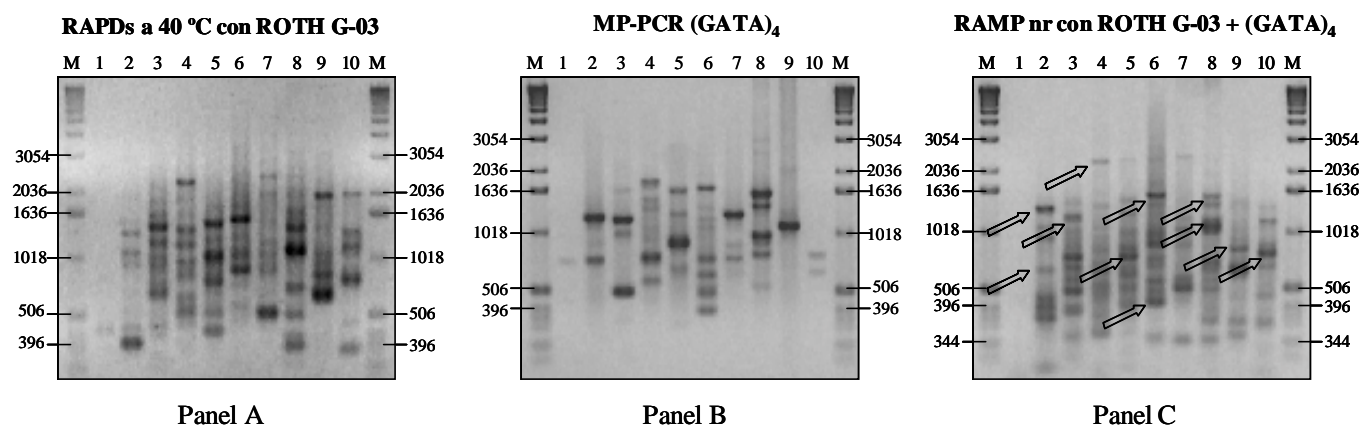


FIGURA 3. Comparación de perfiles de DNA obtenidos a 40 °C con el iniciador aleatorio ROTH G-03 (Panel A), con el microsatélite (GATA)₄ (Panel B) y con RAMPnr (Panel C) donde se combinaron ambos iniciadores. M: marcador de peso molecular de 1 kb; 1: blanco, 2: *Cicer arietinum* L., 3: *Phaseolus vulgaris* L., 4: *Arachis hypogaea* L., 5: *Medicago sativa* L., 6: *Lens esculenta* Moench, 7: *Vicia faba* L., 8: *Glycine max* L., 9: *Pisum sativum* L., 10: *Tamarindus indica* L. Las flechas señalan algunos fragmentos detectados en RAMPnr presentes en los paneles A y B.

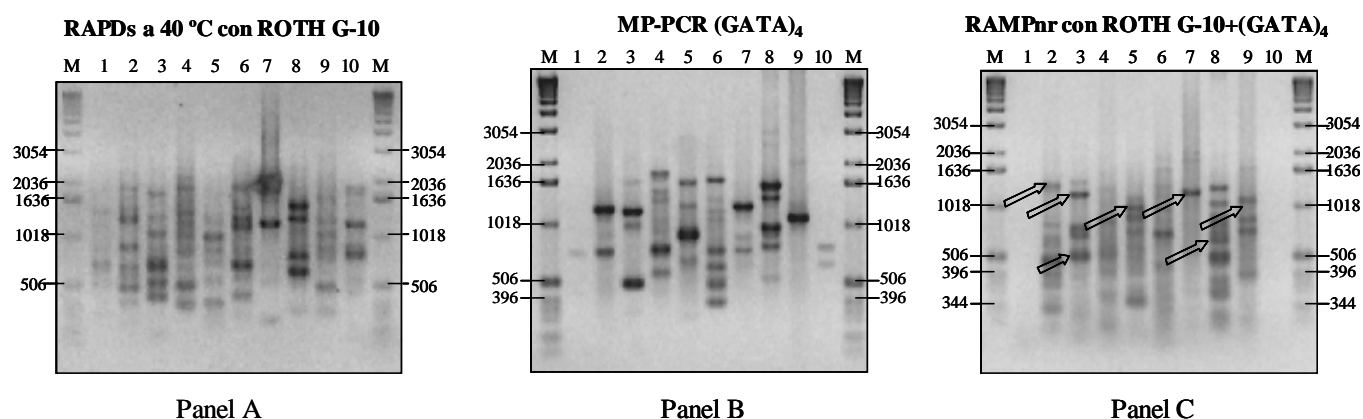


FIGURA 4. Comparación de perfiles de DNA obtenidos a 40 °C con el iniciador aleatorio ROTH G-10 (Panel A), con el microsatélite (GATA)₄ (Panel B) y con RAMPnr (Panel C) donde se combinaron ambos iniciadores. M: marcador de peso molecular de 1 kb; 1: blanco, 2: *Cicer arietinum* L., 3: *Phaseolus vulgaris* L., 4: *Arachis hypogaea* L., 5: *Medicago sativa* L., 6: *Lens esculenta* Moench, 7: *Vicia faba* L., 8: *Glycine max* L., 9: *Pisum sativum* L., 10: *Tamarindus indica* L. Las flechas señalan algunos fragmentos detectados en RAMPnr presentes en los paneles A y B.

canos entre sí, incapaces de definirse en geles de agarosa. Esto último puede superarse utilizando geles de acrilamida para separar los productos RAMPnr, e incluso puede incrementarse la nitidez tiñendo los amplicones con plata (Weising *et al* 1998). Los perfiles detectados con RAMPnr no se comparan con los que se obtienen con la técnica de AFLP, que se ha considerado la mejor alternativa para detectar mayor cantidad de polimorfismos en cualquier genoma en un solo experimento (Valadez *et al* 2000; Pejic *et al* 1998), pero proporcionan información nueva que también se acerca a las variaciones que pudieran presentar los genomas que se comparen, y con mayor probabilidad que las técnicas de RAPDs o MP-PCR. Resultados similares fueron reportados por Weising *et al.* (1995) quienes detectaron patrones reproducibles y precisos al utilizar iniciadores con alto contenido de GC a T_m de 40 °C o 42 °C en *C. arietinum*.

CONCLUSIONES

La modificación a la técnica de RAMP (RAMPnr) empleada en este estudio demostró ser una herramienta que se puede utilizar de manera confiable, reproducible y sin riesgos de radiación que no requiere infraestructura sofisticada. Es factible que su aplicación para estimaciones de diversidad genética, sobre todo en especies endogámicas incremente la posibilidad de detectar polimorfismos de DNA de manera rápida, eficiente y reproducible tal como ha sido mostrado por Valadez-Moctezuma (2000) en *Cicer arietinum* L. La probabilidad de que los resultados obtenidos sean reproducibles con iniciadores RAPDs se incrementa, debido a que estos iniciadores se seleccionan a T_m altas (mayor de 35 °C) definida por el iniciador para microsatélites con el que se combinan. Los análisis RAMPnr proporcionan una nueva alternativa para analizar prácticamente cualquier genoma, invirtiendo el mismo tiempo e insumos de laborato-

rio que cualquier metodología basada en la PCR; en este sentido, nosotros hemos realizado estudios de diversidad genética en algunos organismos patógenos de plantas (*Fusarium oxysporum*) y en germoplasmas de *Cicer arietinum* L. y *Medicago sativa* L., con resultados bastante satisfactorios (en proceso de publicación).

LITERATURA CITADA

- AL-ZAHIM, M.; NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HorScience* 32(6): 1102-1104.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. 2001. Plant genotyping using arbitrarily amplified DNA, pp. 29-46. *In*: Plant Genotyping: the DNA fingerprinting of plants. CABI Publishing, CAB International. Wallingford, UK.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- HOELZEL, A. R. 1992. Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press. Oxford University Press. New York, USA. 315 p.
- HÜTTEL B.; WINTER, P.; KAHL, G. 1997. Generation on Simple Repetitive Sequence-mediated DNA markers for the analysis of chickpea populations, pp. 127-142. *In*: DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.
- KAEMMER, D.; RAMSER, J.; SCHÖN, M.; WEIGAND, F.; SAXENA, M. C.; DRIESEL, A. J.; KAHL, G.; WEISING, K. 1992. DNA fingerprinting of fungal genomes: A case study with *Ascochyta rabiei*. *Adv. in Mol. Gen.* 5: 255-270.
- MOXON, R. E.; WILLS, C. 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution?. *Sci. Am.* 280(1): 72-77.
- PÄÄBO, S. 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1939-1943.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- PENNER, G. A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S. J.; FEDAK, G. 1993. Reproducibility of Random Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. *PCR Methods and Applications* 2(4): 341-345.
- SÁNCHEZ DE LA HOZ, M. P.; DÁVILA, J. A.; LOARCE, Y.; FERRER, E. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39: 112-117.
- SHARMA, P. C.; WINTER, P.; BÜNGER, T.; HÜTTEL, B.; KAHL, G. 1997. Expanding the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea, pp.175-198. *In*: DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta blight in Chickpea. International Center for Agricultural Research in the dry Areas. Aleppo, Syria.
- STAUB, J.; BACHER, J.; POETTER, K. 1996. Sources of potential errors in the application of Random Amplified Polymorphic DNAs in cucumber. *HortScience.* 31(2): 262-266.
- STAUB, E.; SERQUEN, F. C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31(5): 729-741.
- VALADEZ MOCTEZUMA, E.; KAHL, G. 2000. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundiprensa. D. F., México. 182 p.
- VALADEZ MOCTEZUMA, E. 2000. Estimación de la variabilidad genética de la colección de germoplasma de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) existente en México con técnicas moleculares. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. D. F., México.
- VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; KAHL, G.; RAMSER, J.; HÜTTEL, B.; RUBLUO-ISLAS, A. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Méx.* 24(1): 103-120 p.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Boca Ratón, FL., USA. 322 p.
- WEISING, K.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; KAHL, G. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. *Crop Sci.; Recent Advances* 1(1): 113-143.
- WINTER, P.; KAHL, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438-448.
- WU, K.; JONES, R.; DANNEBERGER, L.; SCOLNIK, P. A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22: 3257-3258.
- YANG, W.; DE OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J. L. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676.