

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RAPDs DE UNA COLECCIÓN DE NOPAL DE (*Opuntia* spp. Cactaceae) DEL CENTRO DE MÉXICO, COMO BASE DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO

C. Mondragón-Jacobo¹

¹Programa de Nopal y Frutales. Campo Experimental Norte de Guanajuato. INIFAP. Apdo. Postal 25.
Km. 67 Carretera Querétaro-San Luis Potosí. Correo-e: jacob77@hotmail.com.

RESUMEN

Se estudiaron 32 colectas de nopal de la región Centro de México por medio de la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) incluyendo cultivares comerciales y selecciones de nopal de tuna y verdura. Se probaron 46 iniciadores de diez bases, de los cuales se seleccionaron nueve, asociados con 56 bandas polimórficas. La técnica RAPD permitió la separación en once grupos discretos. El coeficiente de parentesco (CR) varió de 0.32 observado entre VAL y BUR hasta 1.0 asociado con los genotipos CP18 y 'Reyna'. Los nopales cultivados se agruparon juntos y presentaron valores de CR superiores a 0.8, sugiriendo que fueron originados por un pequeño grupo de nopales emparentados entre sí. El CR entre las accesiones silvestres y domesticadas fue de 0.65. Las entradas CP18 y 'Reyna' podrían ser redundantes. El CR entre ACNF y RCNF correspondió con su semejanza fenotípica y puede ser usado como base en la búsqueda de marcadores moleculares para color de fruto.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: germoplasma, clasificación, ADN polimórfico, PCR, RAPD, caracterización.

MOLECULAR CHARACTERIZATION USING RAPDs OF A CACTUS (*Opuntia* spp. Cactaceae) COLLECTION FROM CENTRAL MEXICO AS A BASIS FOR PLANT BREEDING

SUMMARY

Thirty two cactus collections from the Central Mexico region were studied using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique; they included commercial cultivars and prickly pear and vegetable cacti. We tested 46 10-base primers. Nine of them were selected, which were associated with 56 polymorphic bands. The RAPD technique separated the materials into eleven discrete groups. The coefficient of relatedness (CR) varied from 0.32 between Val and BUR up to 1.0 in genotypes CP18 and 'Reyna'. Cultivated cacti were grouped together and showed CR values higher than 0.8, suggesting that they originated from a small group of related cacti parents. CR between wild and domesticated cacti was 0.65. Entries CP18 and 'Reyna' could be redundant. The similarity between ACNF and RCNF corresponded to their phenotypic resemblance. This pair can be used as a basis in the search of molecular markers for fruit color.

ADDITIONAL KEY WORDS: germplasm, classification, polymorphic DNA, PCR, RAPD, characterization.

INTRODUCCIÓN

La colección y caracterización de germoplasma se ha basado tradicionalmente en caracteres fenotípicos. El conocimiento de las descripciones detalladas son necesarias en la utilización del germoplasma, debido a que en dicho germoplasma puede haber genes valiosos para utilizarse en los programas de mejoramiento. La colección extensiva y el mantenimiento de germoplasma son costosos. Kresovich *et al.* (1993) señalaron que este es uno de los problemas más importantes de las colecciones *in vivo*. Estos problemas se agravan cuando se trata de

especies perennes. La identificación del germoplasma y el análisis de los esfuerzos futuros de colección son facilitados si se entiende la naturaleza de la variabilidad.

En el caso de nopal existen descripciones de los cultivares comerciales (Muñoz *et al.*, 1995; Mondragón y Pérez, 1996). Existen también descripciones parciales para algunas selecciones sobresalientes (Valdés *et al.*, 1997a y 1997b), para genotipos tolerantes a heladas (Parish y Felker, 1997). Pero, el problema estriba en que la morfología puede variar debido a los efectos del ambiente y son

comunes los errores de apreciación en los descriptores, sobre todo con relación en los caracteres cualitativos.

Chessa *et al.* (1997) reportaron la descripción de nopales italianos por medio de isoenzimas. Analizaron 32 entradas con 13 sistemas enzimáticos en preparaciones de raíces, cladodios, pétalos y polen. Solamente las enzimas malato deshidrogenasa y fosfoglucoisomerasa en preparaciones de polen fueron importantes para la discriminación de los grupos. Los patrones de bandas obtenidos permitieron la definición de varios grupos asociados con el origen geográfico de las colectas, pero únicamente los biotipos de Sardinia fueron discriminados por el color de fruto. Mediante el uso de electroforesis utilizado por Uzun (1997) con 18 cultivares, 15 colectados en Turquía y tres de Italia, en el que se probaron siete sistemas enzimáticos, no se encontró variación. El germoplasma de Turquía probablemente sea de una base genética más limitada que el Italiano. Ambos habrían sido originados de las plantas introducidas de México después del siglo XVI (Barbera 1995).

La identificación de cultivares puede ser realizada con las huellas de ADN, especialmente en genotipos con alta variación genética entre cultivares y muy poca dentro del cultivar. Esto también aplica para el caso de isoenzimas. Tales ejemplos son encontrados en plantas de propagación vegetativa derivados de especies de polinización cruzada como la mayoría de los frutales (Nelson *et al.*, 1994).

Los organismos vivos pueden revelar regiones con secuencias diferentes de nucleótidos (polimorfismos) que los diferencian de otros individuos, de manera similar a las huellas dactilares (Trigiano y Caetano-Anollés, 1998). Cada segmento amplificado deriva de una región que contiene dos segmentos cortos de ADN con alguna homología con el iniciador. Estos segmentos deben estar presentes en cadenas complementarias de ADN y ubicados lo suficientemente cerca para que ocurra la amplificación del ADN (Rafalski y Tingey, 1993). Los fragmentos polimórficos son heredados de forma Mendeliana y pueden ser obtenidos de cualquier especie aun sin contar con información de la secuencia del ADN (Williams *et al.*, 1992). Los RAPD son marcadores usualmente dominantes con polimorfismos entre individuos definidos por la presencia o ausencia de una banda en particular.

De acuerdo con Tingey y del Tufo (1993), cada iniciador en promedio dirigirá la amplificación de varios loci discretos en el genoma, permitiendo seleccionar secuencias polimórficas de nucleótidos entre individuos. El número y tamaño de los fragmentos dependerá de la secuencia de nucleótidos del iniciador y la fuente de ADN, resultando en una huella de ese genoma o de la fracción aleatoria del ADN amplificado. El número de bandas puede ser muy alto dada la cantidad de iniciadores disponibles (1200) considerando solamente los de Operon Technolo-

gies y el número de bandas producido por cada uno, sin embargo, también existen iniciadores que no amplifican ninguna banda.

Las técnicas moleculares conjuntamente con los enfoques clásicos pueden ser empleadas para: identificación, separación, medición de la variación genética, establecimiento de relaciones genéticas, y correlación entre marcadores con caracteres deseables para introgresión (Kresovich *et al.*, 1993).

Las mayores ventajas de los ensayos RAPD es que no se requiere información previa de las secuencias genéticas, el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar y usa fluorescencia en lugar de radioactividad (Williams *et al.*, 1992). Debido a que es una técnica basada en la multiplicación de fragmentos, solamente se necesitan nanogramos de ADN y es factible la automatización.

La naturaleza dominante de los marcadores de ADN puede ser una desventaja debido a que la identificación de heterocigotos no es posible. La desventaja principal es la reproducibilidad de los resultados, debida a la competencia entre fragmentos de ADN, el tipo de polimerasa, el equipo de termociclado y las condiciones de electroforesis (Williams *et al.*, 1993). Estos inconvenientes son factibles de minimizarse optimizando los métodos de extracción de ADN, manteniendo condiciones de laboratorio estándares y usando reactivos de calidad controlada.

En este estudio se presentan los resultados de la aplicación de la técnica RAPD a 32 colectas de nopal de la región central de México, con el objetivo de desarrollar una base de datos que permita identificar nuevas entradas y reducir la redundancia en la colección. Asimismo se busca establecer posibles asociaciones entre algunos cultivares comerciales y algunas selecciones. Esta información es útil para dirigir los esfuerzos futuros de recolección y en la selección de progenitores para cruza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos

Se colectaron cladodios maduros de nopal (*Opuntia* spp.) del banco de germoplasma del Campo Experimental Norte de Guanajuato del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y de algunas plantaciones selectas. Se incluyeron las siguientes cultivares: 'Reyna', 'Esmeralda', 'Cristalina' y 'Roja Lisa', y las selecciones para tuna obtenidas por el Colegio de Postgraduados durante los años setenta CP1, CP14, CP18 y CPV1 de nopal de verdura. Otras selecciones para fruta o verdura fueron también incluidas, tales como Spineless 1308 (*Nopalea cochenillifera*) originaria del estado de Tamaulipas, México e introducida a Texas en los años ochenta. Como testigo se consideró al nopal or-

CUADRO 1. Variedades y selecciones de nopal de la región central de México utilizadas en la caracterización molecular mediante RAPDs

Entrada	Clasificación Actual	Usos	Espinas en Cladodios	Clave	Estado Actual
Amarilla CNF	<i>O. ficus-indica</i>	F /V	Ausentes	ACN	Traspatio
Blanco Uruapan	<i>O. ficus-indica</i>	V	Ausentes	BUR	Comercial
Burrona	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	BR	Comercial
Camuesa	<i>O. robusta</i>	F	Ausentes	CAM	Traspatio
Cardona	<i>O. streptacantha</i>	F, FF	Presentes	CAR	Traspatio
Centenario	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	CEN	Comercial
Copena 1	<i>O. albi-carpa</i>	F	Presentes	CP1	Comercial
Copena 14	<i>O. albi-carpa</i>	F	Presentes	CP14	Comercial
Copena 18	<i>O. albi-carpa</i>	F	Presentes	CP18	Comercial
CPF1	<i>O. ficus-indica</i>	FF	Ausentes	CPFI	Comercial
CPV1	<i>O. ficus-indica</i>	V/FF	Ausentes	CPV1	Comercial
Chapeada	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	CHAP	Traspatio
Cristalina	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	CRIS	Comercial
Duraznillo	<i>O. leucotricha</i>	FF/O	Presentes	DUR	Silvestre
Esmeralda	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	ESM	Comercial
Fafayuco	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	FAF	Traspatio
Torreaja	<i>O. sp</i>	F	Presentes	TORR	Comercial
Italiano	<i>O. ficus-indica</i>	V	Ausentes	ITA	Comercial
Liria	<i>O. sp</i>	F	Presentes	LIR	Traspatio
Milpa Alta	<i>O. ficus-indica</i>	V	Ausentes	MA	Comercial
Naranjona	<i>O. megacantha</i>	F	Presentes	NAR	Comercial
Redonda	<i>O. ficus-indica</i>	V	Ausentes	RED	Comercial
Reyna	<i>O. albi-carpa</i>	F	Presentes	REY	Comercial
Boiler	<i>O. humifusa</i>	O	Ausentes	BOI	Ornamental
Roja CNF	<i>O. ficus-indica</i>	F/FF	Ausentes	RCNF	Traspatio
Roja San Diego	<i>O. ficus-indica</i>	F	Ausentes	RSD	Comercial
Rosalito	<i>O. ficus-indica</i>	F/FF	Ausentes	ROS	Traspatio
Sel. Pabellón	<i>O. ficus-indica</i>	F	Ausentes	SELP	Comercial
Tamazunchale	<i>N. cochellinifera</i>	V	Ausentes	TAM	Comercial
Tapona 1	<i>O. robusta</i>	V	Presentes	TAP1	Silvestre
Tlaconopal	<i>O. ficus-indica</i>	V	Ausentes	TLA	Traspatio
Valtierrilla	<i>O. sp.</i>	V	Presentes	VAL	Comercial
Xoconoxtle	<i>O. joconoxtle</i>	F	Presentes	XOC	Comercial

F: Fruta; V: Verdura; FF: Forraje, O.: *Opuntia*; N.: *Nopalea*.

namental *Opuntia humifusa* (Cuadro 1). Los cladodios fueron cultivados en invernadero suministrando material fresco para los ensayos de laboratorio. Se plantaron tres cladodios por colecta, provenientes de un solo individuo.

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo para *Opuntia* reportado por Mondragón *et al.* (2000), el método es una variante del

método del cetil-trimetil-borato de amonio (CTAB) reportado por Dellaporta *et al.* (1993). Las modificaciones incluyeron, optimización del tamaño de muestra, incorporación de polivinilpirrolidona insoluble, incremento del tiempo de centrifugación y de separación de la pastilla de ácidos nucleicos en baño maría. Dichas modificaciones reducen el problema de la presencia de mucílago en la muestra, el cual provoca la gelificación de la muestra dificultando la centrifugación y la separación de la pastilla de ADN.

Protocolo de amplificación de fragmentos RAPD

Se utilizó el protocolo reportado por Conner *et al* (1997) para la caracterización de manzanas. Cada reacción incluyó: 2.5 ml del buffer 10X para PCR; 1.25 ml de la mezcla de deoxinucleótidos al 2.5 mM; una unidad de *Taq* polimerasa; 1.5 ml del iniciador al 10 mM; 2.5 ml de $MgCl_2$ a una concentración de 25 mM, la reacción se completó con aproximadamente 20 ng de ADN genómico, llevándola a un volumen final de 25 ml con agua destilada y deionizada. Las reacciones PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C; desnaturalización por 30 segundos a 95 °C; alineación por 1 minuto a 45 °C; extensión por 1 minuto a 72 °C; extensión final por 5 minutos a 72 °C. Las amplificaciones PCR se hicieron en un termociclador PTC100 (Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.) programado a 40 ciclos. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en agarosa al 1.6 % y buffer de 1x tris-borato-EDTA. Los geles corrieron durante 1.5 horas a 100 voltios y fueron teñidos con bromuro de etidio.

Repetibilidad de las reacciones RAPD

Se seleccionaron nueve muestras para probar el protocolo de Conner *et al.* (1997) en cuatro reacciones independientes usando el mismo termociclador.

Selección de iniciadores

Se ensayaron 46 oligonucleótidos de 10 bases (Operon Technologies Alameda, CA) de las series C, G, M, y A con un juego de ocho muestras de ADN seleccionadas al azar. Debido a la falta de información previa específica de *Opuntia* se ensayaron los iniciadores disponibles, el estudio completo comprendió 15 iniciadores, de los cuales se seleccionaron solamente nueve (OPA 02 TGCCGAGCTG; OPG 01 CTACGGAGGA; OPG 03 GAGCCCTCCA; OPG5 CTGAGACGGA; OPG 07 GAACCTGCGG; OPG 13 CTCTCCGCCA; OPG 15 ACTGGGACTC; OPC 06 GAACGGACTC y OPM 12; GGGACGTTGG) que mostraron presencia de bandas polimórficas, además de consistencia y facilidad de observación de las bandas en los geles.

Construcción de la matriz de datos

Las bandas polimórficas fueron consideradas como presentes o ausentes en una matriz binaria de iniciadores y bandas. La variación entre entradas fue evaluada en comparaciones apareadas considerando la proporción de bandas compartidas. Las relaciones entre genotipos fueron evaluadas por medio del análisis de conglomerados usando la media aritmética del grupo (UPGMA: Unweighted Pair Group Method). Con esta información se creó un dendrograma usando la opción TREE del programa NTSYS (Numerical Taxonomy System) versión 1.70 (Rohlf, 1992).

Análisis estadístico

Los límites de confianza de los conglomerados del dendrograma fueron obtenidos por medio de análisis "bootstrap" (muestreo repetido con reemplazo de los caracteres en una matriz de unidades operacionales por caracteres, para crear numerosas matrices del mismo tamaño que la original) del programa WINBOOT (Yap y Nelson, 1996; Felsenstein, 1985). Los resultados fueron sometidos a 2,000 corridas del WINBOOT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Repetibilidad de las reacciones PCR

Los patrones de bandas de nueve muestras en cuatro reacciones de prueba se presentan en la Figura 1. Se observan ligeras diferencias en la intensidad de los fragmentos, que no afectaron significativamente el conteo final. Los fragmentos polimórficos fueron estables a través de las reacciones de prueba.

Diversidad genética y similitud entre colectas de nopal

Se evaluaron 46 iniciadores de los cuales se seleccionaron nueve asociados con 56 bandas polimórficas. Dos ejemplos de las reacciones obtenidas se presentan en la Figura 2. El número de fragmentos polimórficos varió de 3 con el iniciador OPA 02, hasta 13 con el iniciador OPG 07, en promedio por cada iniciador seleccionado se obtuvieron 6.2 fragmentos. El tamaño de los fragmentos amplificados varió desde 400 hasta 1975 pares de bases aproximadamente.

La Figura 3 presenta el dendrograma obtenido con el método UPGMA. Este dendrograma ilustra la similitud entre y dentro de grupos de colectas basados en el número de fragmentos polimórficos compartidos. El dendrograma provee una estimación al 95 % de confianza, en comparación Nelson *et al.* (1994), en un estudio sobre el patógeno de la "quemadura" del arroz (*Xanthomonas oryzae*) por medio de RFLPs consideró valores de 70 % como robustos y fueron usados para obtener conclusiones.

La técnica permitió encontrar grupos de nopales que pertenecen a la misma especie, o que comparten caracteres fenotípicos similares. Estos grupos están conformados por individuos que comparten caracteres genéticos, en este caso productos de amplificación de ADN. Es razonable inferir que dos materiales emparentados comparten un alto número de fragmentos polimórficos.

Algunos caracteres son producto de la selección llevada a cabo en solares de productores (Pimienta y Urias, 1995), como los cladodios sin espinas o los colores de fruto. Sin embargo, también se encontraron grupos para los

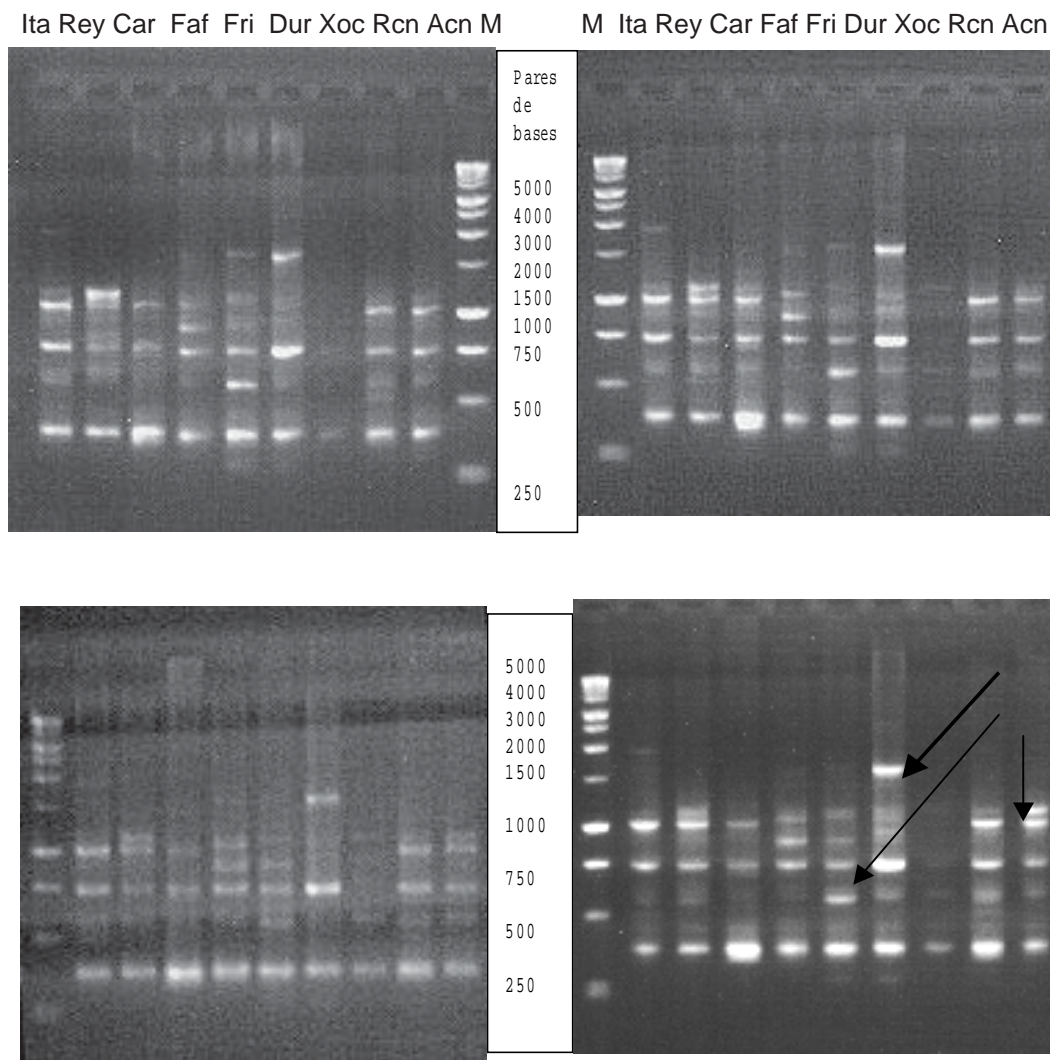


Figura 1. Patrones de amplificación RAPD de cuatro reacciones independientes con nueve muestras de ADN de *Opuntia* con el iniciador OPC 06. Las muestras incluyeron cultivares comerciales como 'Italiano' (Ita), 'Reyna' (Rey), 'Fafayuco' (Faf), 'Torreoja' (Fri), y colectas silvestres como 'Cardona' (Car) y 'Duraznillo' (Dur), además de 'Xoconoxtle' (Xoc) el cual pertenece a *O. joconoxtle*. Las flechas indican ejemplos de bandas polimórficas (M= marcador de ADN: escalera de 1 Kb de PROMEGA).

cuales con la información disponible no se tiene otra explicación más que son producto de un artificio de la técnica. El coeficiente de parentesco varió de 0.32 observado entre 'Valtierrilla' y 'Blanco Uruapan' hasta 1.0 asociado con las accesiones 'CP18' y 'Reyna'.

En el dendrograma se observan dos divisiones conformadas por nopales cuasi-silvestres y nopales domesticados. La primera división incluyó a 'Boiler' (el testigo externo) y 'Blanco Uruapan', 'Boiler' es de hábito postrado con frutos pequeños sin valor hortícola, seleccionada como contraste por su escaso parecido con los nopales cultivados. 'Blanco Uruapan' es arborescente con apariencia silvestre, esto es pencas y frutos pequeños, pero es utilizada para la producción de nopalitos en Michoacán y Guanajuato por sus cladodios delgados. No se observan caracteres adicionales que ligen estas accesiones. El grupo de los nopales domesticados, está

compuesto de genotipos encontrados tanto en nopaleras de solar como comerciales. El CR entre las colectas silvestres y domesticadas fue de 0.65.

La segunda división comprendió varias colectas que se separaron individualmente: 'Tamazuchale', 'Duraznillo' y 'Cardona', considerados como especies: 'Tamazuchale' es reportado como *Nopalea cochellinifera* por Bravo (1978), 'Duraznillo' es *O. leucotricha* (Gibson y Nobel, 1986; Scheinvar, 1995) y 'Cardona' es *O. streptacantha*, todos ellos producen frutos pequeños.

Dentro de los nopales domesticados 'Xoconoxtle' y 'Roja San Diego' se separaron individualmente, el primero pertenece a la especie *O. joconoxtle* Weber mientras que 'Roja San Diego' es un nopal de verdura clasificado como *O. ficus-indica* L. Mill. (Scheinvar, 1995). Para los

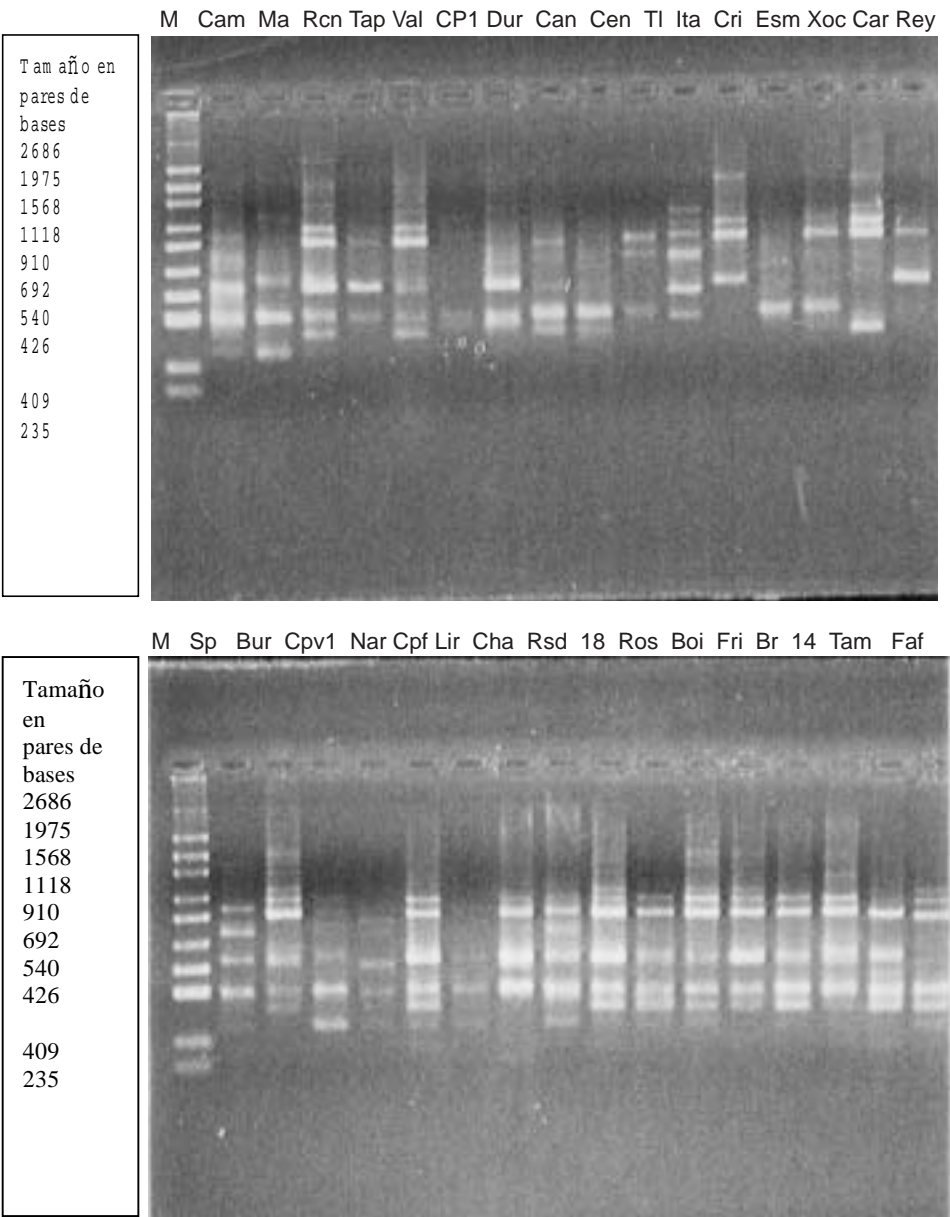


Figura 2 . Patrones de amplificación de reacciones RAPD de 32 muestras de ADN de nopales procedentes de la region central de México, con el primer OPM-12. M: marcador de ADN; pUC19 de Biosynthesis Inc.; Cam: ‘Camuesa’; Ma: ‘Milpa Alta’; Rcn: ‘Roja CNF’; Tap: ‘Tapona’; Val: ‘Valtierrilla’; CP1: ‘COPENA 1’; Dur: ‘Duraznillo’; Can: ‘Amarilla CNF’; Cen: ‘Centenario’; TI: ‘Tlaconopal’; Ita: ‘Italiano’; Cri: ‘Cristalina’; Esm: ‘Esmeralda’; Xoc: ‘Xoconoxtle’; Car: ‘Cardona’; Rey: ‘Reyna’; Sp: ‘Selección Pabellón’; Bur: ‘Blanco Uruapan’; CPV1: CPV1; Nar: ‘Naranja’; Cpf: CPF1; Liv: ‘Liria’; Cha: ‘Chapieada’; Rsd: ‘Roja San Diego’; 18: ‘Copena 18’; Ros: ‘Rosalito’; Boi: ‘Boiler’; Fri: ‘Torreaja’; Br: ‘Burrona’; 14: ‘Copena 14’; Tam: ‘Tamanzunchale’; Faf: ‘Fafayuco’.

subgrupos formados por; ‘Tlaconopal’ y ‘Torreaja’ así como ‘Rosalito’, ‘Chapeada’ y ‘Naranja’ las causas de su asociación no son claras.

Dentro de los nopales domesticados se encontró un grupo bien definido que se denominó “robustas” compuesto por ‘Camuesa’ y ‘Tapona 1’ con un coeficiente de parentesco de 0.83. Ambas entradas están clasificadas como *O. robusta*. Son característicos sus cladodios casi circulares, de color grisáceo y los frutos morados, jugosos, de baja calidad. Ambas son una fuente interesante de genes para precocidad ya que maduran en mayo y junio. También

presentan el más bajo nivel de ploidia $2x=4n=44$ (Muñoz *et al.*, 1995). ‘Tapona 1’ posee cladodios espinosos mientras que ‘Camuesa’ presenta cladodios lisos con gloquidias cortas.

Los genotipos ‘Roja CNF’ y ‘Milpa Alta’ e ‘Italiano’ poseen patrones de fragmentos RAPD sensiblemente similares, las plantas de ambos genotipos difieren principalmente en el color de fruta, el cual es rojo para el caso de ‘Roja CNF’ y amarillo para ‘Amarilla CNF’ y ‘Milpa Alta’. La organización de estos genotipos en el mismo subgrupo así como el alto valor de similaridad (0.95 a 1.0)

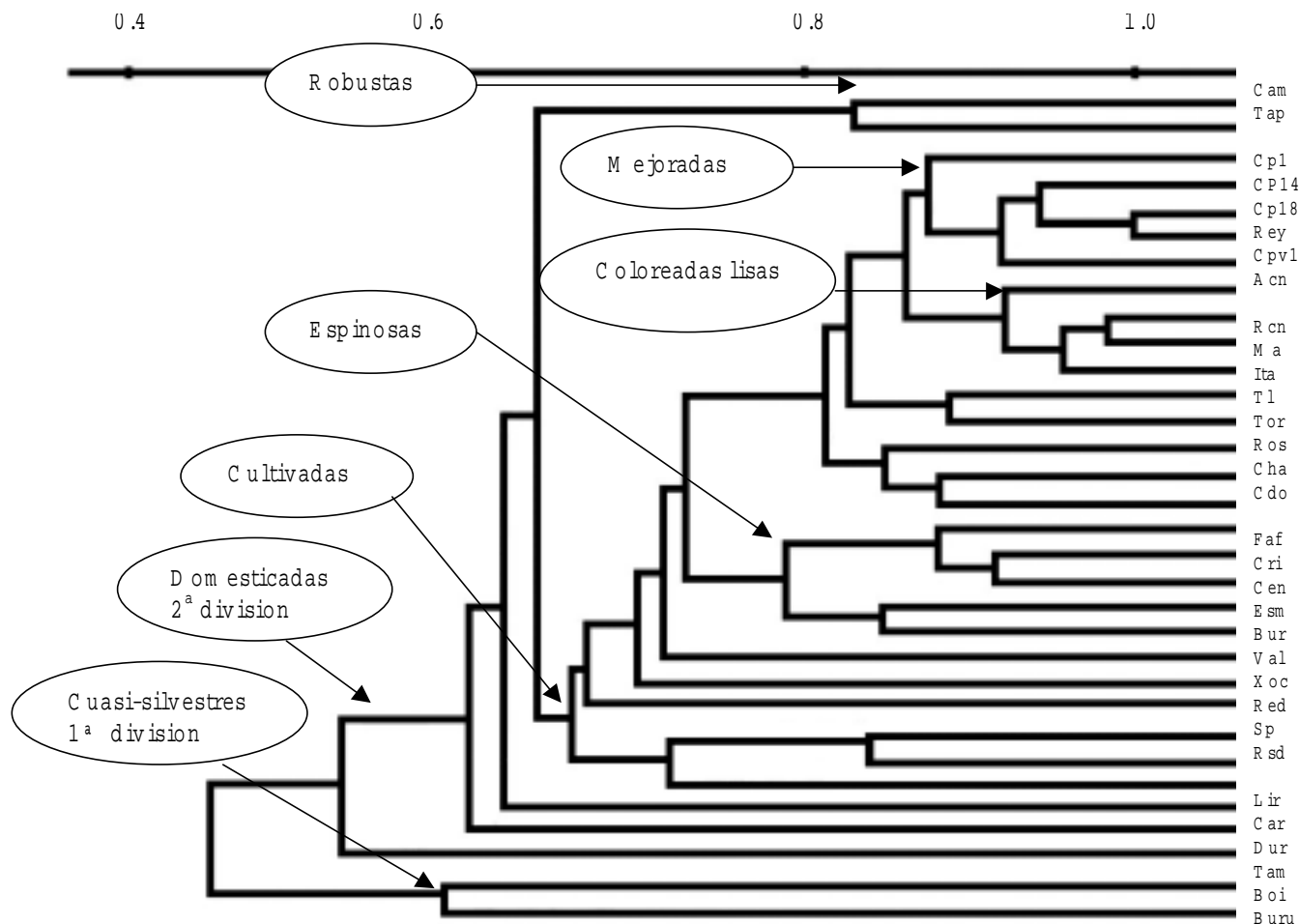


Figura 3. Agrupación de 32 colectas de nopales de la región central de México basada en la presencia-ausencia de fragmentos polimórficos (RAPDs). Los grupos fueron definidos usando el programa WINBOOT en la modalidad de muestreo repetido con reemplazo después de 2000 corridas. Cam: 'Camuesa'; Ma: 'Milpa Alta'; Rcn: 'Roja CNF'; Tap: 'Tapona 1'; Val: 'Valtierrilla'; CP1: 'COPENA 1'; Dur: 'Duraznillo'; Can: 'Amarilla CNF'; Cen: 'Centenario'; Tl: 'Tlaconopal'; Ita: 'Italiano'; Cri: 'Cristalina'; Esm: 'Esmeralda'; Xoc: 'Xoconoxtle'; Car: 'Cardona'; Rey: 'Reyna'; Sp: 'Selección Pabellón'; Bur: 'Blanco Uruapan'; CPV1: 'CPV1'; Nar: 'Naranjona'; Cpf: 'CPF1'; Liv: 'Liria'; Cha: 'Chapieada'; Rsd: 'Roja San Diego'; 18: 'Copena 18'; Ros: 'Rosalito'; Boi: 'Boiler'; Fri: 'Torrejoja'; Br: 'Burrona'; 14: 'Copena 14'; Tam: 'Tamanzunchale'; Faf: 'Fafayuco'.

evidencia su parentesco, el cual podría utilizarse en la búsqueda de marcadores moleculares para color de fruta, carácter expresado solamente durante la etapa reproductiva. Su detección temprana en progenies de cruza ahorraría tiempo y aceleraría la obtención de nuevos cultivares de colores específicos.

Los nopales cultivados se agruparon al centro del dendrograma y presentaron valores de CR superiores a 0.8, sugiriendo que pudieron haber sido originados por un pequeño grupo de progenitores. De acuerdo con Pimienta (1990) y Pimienta y Muñoz (1995) los cultivares modernos (incluyendo quizá algunas de las selecciones incluidas en este estudio) pudieron haberse originado en los traspatios, como resultado del cruzamiento natural favorecido por la alogamia observada en el nopal, así como la sincronía de la floración. En estos sitios las plantas están muy cercanas entre sí, para aprovechar el espacio. El nopal es parcialmente polinizado por insectos y puede reproducirse

por semilla incrementando las posibilidades del entrecruzamiento.

El subgrupo identificado como "espinosas" en el dendrograma comprendió a los genotipos 'Fafayuco', 'Cristalina' y 'Centenario', 'Esmeralda' y 'Blanca Uruapan', los cuales son considerados cultivares comerciales en el mercado mexicano, sus principales características son: alto vigor de las plantas, la presencia de espinas y los frutos grandes.

Cuatro entradas formaron un subgrupo con los más altos valores de CR: CP1, CP14, CP18 y 'Reyna', el subgrupo compartió un valor de CR de 0.9. La comparación entre CP18 y 'Reyna' se asoció con un valor de 1.0, lo que indica que son entradas repetidas en la colección. La falta de registros complica la verificación, sin embargo, se puede asumir que los progenitores de estos cultivares compartían numerosos caracteres. Ambas son espinosas, con frutos

de color verde claro, jugosos y con alto contenido de azúcares. CP18, CP14 y CP1 comparten el mismo fenotipo y fueron obtenidos por hibridación de las selecciones Mex 23 x Hidalgo 64, cuya progenie fue sometida a selección y evaluada en diferentes regiones semiáridas de México. Ambos progenitores pertenecen al tipo de tuna "Blanca alfajayucan" de San Martín de las Pirámides (Pimienta, 1990). Este grupo es importante para la generación de nuevos cultivares ya que poseen características muy apreciadas por el consumidor mexicano.

Un segundo subgrupo lo constituyeron: 'Amarilla CNF', 'Roja CNF' e 'Italiana', todas ellas sin espinas, con nopalitos de buena calidad y con frutos atractivos, pero todavía desconocidos para el mercado nacional. 'Italiana' y 'Amarilla CNF' producen frutos amarillos y 'Roja CNF' frutos rojos. Debido al alto valor de CR (0.96), 'Amarilla CNF' y 'Roja CNF' podrían considerarse como cultivares emparentados. Las plantas son muy similares pero los frutos son de diferente color, lo cual probablemente se debe a la acción de pocos genes, entre ellos los que determinan el color de la fruta. Este hallazgo podría ayudar en la búsqueda de marcadores moleculares asociados al color de la fruta, carácter que es observable a partir del cuarto año en plantas obtenidas de semilla, y que potencialmente puede ser incorporado a los criterios de selección (Mondragón, 2001 y Chapman *et al.*, 2002).

Selección 'Pabellón' y 'Roja San Diego' presentaron 0.82 de CR, estas entradas se clasifican como *O. ficus-indica*, poseen cladodios lisos de usos múltiples. Son plantadas por sus frutos de color rojo y sus nopalitos. 'Pabellón' puede ser plantada a altas densidades para forraje. En el mismo grupo de 'Pabellón' y 'Rosalito' se encuentra 'Liria' con un valor inferior de CR (0.74) una selección interesante por sus frutos de color morado.

CONCLUSIONES

La técnica RAPD permitió la separación de 32 entradas de nopal en ocho grupos discretos y seis colectas individuales, discriminando especies, selecciones domesticadas y mejoradas, y colectas probablemente repetidas.

Las colectas cultivadas exhibieron un CR superior a 0.8, apoyando la idea de que fueron originados por un grupo pequeño de progenitores comunes.

Se encontraron altos valores de RC entre las entradas 'CP18' y 'Reyna' y entre 'Milpa Alta' e 'Italiana' sugiriendo que son entradas repetidas, permitiendo usarlas indistintamente en cruces.

La similitud entre las entradas 'Amarillo CNF' y 'Rojo CNF', corresponde con su fenotipo y puede ser usada en

la búsqueda de marcadores moleculares para color de fruto. Estos marcadores permitirían la selección de individuos en la etapa juvenil, incrementando la eficiencia del mejoramiento.

LITERATURA CITADA

- BARBERA, G. 1995. Historia. *In*: Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal. Barbera G. Ingles P. y Pimienta Barrios E. (eds.). Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 132. Roma.
- BRAVO-HOLLIS, H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. D. F., México. 743 p.
- CHAPMAN, B.; MONDRAGON-JACOBO C.; BUNCH, R.; PATTERSON, A. H. 2002. Breeding and Biotechnology, pp. 255-271. *In*: Cacti Biology and Uses. Nobel P. S. (ed). Univ. of California Press. Berkeley, USA.
- CHESSA, I.; NIEDDU, G.; SERRA P.; INGLESE, P.; LA MANTIA, T. 1997. Isozyme characterization of *Opuntia* species and varieties from Italian germplasm. *Acta Hort.* 438: 45-52.
- CONNER, J. P.; BROWN, S.K.; WEEDEN, F. N. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(3): 350-359.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, L. J.; y HICKS, J. B. 1993. A plant DNA micropreparation. Version II. *Plant Mol. Biol. Rpt.* 1: 19-21.
- FELSESTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- GIBSON, C. A.; NOBEL P.S. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA. 268 p.
- KRESOVICH, S.; WILLIAMS, J. G. K.; MCFERSON, J. R.; ROUTMAN, E. J.; SCHAAL, B. A. 1993. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 1-7.
- MONDRAGON JACOBO, C.; PÉREZ GONZÁLEZ, S. 1996. Native cultivars of cactus pear in México. pp. 446-450. *In*: Progress in New Crops. Janick J. (ed.) ASHS Press. Arlington, V.A. USA.
- MONDRAGON JACOBO, C.; DOUDAREVA, N.; BORDELON, B. 2000. DNA extraction from several cacti. *HortScience* 35(6) 1121-1126.
- MONDRAGON JACOBO, C. 2001. Cactus pear breeding and domestication. *Plant Breeding Reviews* 20: 135-166.
- MUÑOZ URIAS, A.; GARCÍA VELÁZQUEZ, A.; PIMIENTA BARRIOS, E. 1995. Relación entre los niveles de ploidía y variables anatómicas y morfológicas en especies silvestres y cultivadas de nopal tunero. *Memorias del 6o. Congreso Nacional e Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 7-15.
- NELSON, R. J.; BARAOIDAN, M. R.; VERA CRUZ, C. M.; YAP, I. V.; LEACH, J. E.; MEW, T. W.; NYBOON H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3275-3283.
- PARISH, J.; FELKER, P. 1998. Fruit quality and production of cactus pear (*Opuntia* spp.) fruit clones selected for increased frost hardiness. *J. of Arid Environments* 37:123-143.
- PIMIENTA BARRIOS, E. 1990. El Nopal Tunero. Colección Tiempos de Ciencia. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 246 p.

- PIMIENTA BARRIOS, E.; MUÑOZ-URIAS A. 1995. Domesticación de opuntias y variedades cultivadas, pp. 61-67. *In*: Agroecología Cultivo y Usos del Nopal. Estudio Producción y Protección Vegetal 132. Barbera G., Inglese P. y Pimienta Barrios E. (eds.). FAO. Rome.
- RAFALSKI, A. J.; TINGEY, S. V. 1993. Genetic diagnosis in plant breeding; RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275-279.
- RAFALSKI, A.; SCOTT, T.; WILLIAMS, G.K.J. 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis markers. *Plant Molecular Biology Manual H4*: 114-118.
- ROHLF, J. F. 1992. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System 1.7. Exeter Software. New York, USA.
- SCHEINVAR, L. 1995. Taxonomy of utilized Opuntias, *In*: Agroecology Cultivation and Uses of Cactus Pear. pp. 21-28. Barbera G., Inglese P. y Pimienta Barrios E. (eds.). FAO Plant Production and Protection Paper. 132. Rome, Italy.
- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience* 31(5): 729-740.
- TINGEY, V. S.; DEL TUFO, J. I. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349-352.
- TRIGIANO, R. N.; CAETANO-ANOLLÉS, G. 1998. Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species. *HorTechnology* 8(3): 413-423.
- UZUN, I. 1977. Fruit and cladode isozymes in cactus pear. *Acta Hort.* 438: 45-53.
- VALDES C., R.D.; GALLEGOS V., C.; BLANCO M., F. 1997a. Análisis multivariado de once variedades de nopal tunero. Atributos de fruto. *Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del nopal.* Monterrey, México. pp. 118-119.
- VALDES C., R. D.; GALLEGOS V., C.; BLANCO, M. F. 1997b. Analisis multivariado de once variedades de nopal tunero. Atributos de crecimiento. *Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del nopal.* Monterrey, México. pp. 120-121.
- WILLIAMS, G. K. J.; RAFALSKI J. A.; TINGEY S. V. 1992. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.
- WILLIAMS, J. G. K.; J. A. RAFALSKI; TINGEY, S. V. 1993. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as a genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- YAP, V. I.; NELSON, R. J. 1996. WINBOOT. A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *IRRI Discussion Paper Series no. 14.* International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 23 p.