

La información compendiada en éste libro digital proviene de trabajos presentados durante el marco del 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se de a la información presentada. Los contenidos no necesariamente reflejan las políticas o puntos de vista de la Universidad Autónoma de Guadalajara ni la mención de productos comerciales o servicios implican compromisos o afiliaciones por parte de ésta.

Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cuál se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución.

Documento de Internet

ISBN: 978-607-719-003-5

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan Jalisco.

## Identificación de híbridos interespecíficos e intergenéricos del género *Polianthes* por marcadores AFLP

Tania Lara Bañuelos<sup>1,\*</sup>, Rodrigo Barba González<sup>1</sup>, Patricia Dupre<sup>1</sup>, Ma. Claudia Castañeda Saucedo<sup>2</sup>, Ernesto Tapia Campos<sup>1,+</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. / Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco C.P. 44270, México. / e-mail: etapia@ciatej.net.mx.

<sup>2</sup> Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara (CUSUR-UDG)  
Av. Enrique Arreola Silva No 883, Colonia Centro, C.P.49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

\* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Tel.: (52)-(33)-33455200 ext. 1706; Fax: (52)-(33)-33455200 ext.1001. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco C.P. 44270, México.

Área del Conocimiento: **Biología molecular**

---

**Resumen:** Se usó la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para la detección de híbridos interespecíficos e intergenéricos del género *Polianthes*. Se analizaron 20 híbridos y sus progenitores, 10 híbridos interespecíficos producto de cruza controladas de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *P. howardii* y 10 híbridos intergenéricos de cruza de *P. geminiflora*. var. Clivicola X *Prochnyanthes mexicana*, junto con 2 controles externos de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Se probaron 6 combinaciones de iniciadores *Eco* + 3/ *Mse* + 3 logrando un total de 290 bandas de las cuales 220 (75.65%) fueron polimórficas. El promedio de bandas por combinación fue de 48.3 con un 36.6% de polimorfismo. Las combinaciones *Mse* + CAT/*Eco* ACT y *Mse* CTG/*Eco* ACT, fueron aquellas con mayor número de fragmentos (67 y 44 bandas respectivamente) y a su vez mayor porcentaje de bandas polimórficas (52% y 38% respectivamente). Todas las combinaciones usadas generaron fragmentos que claramente correspondieron a los progenitores, los cuales fueron útiles para confirmar el estatus híbrido de los individuos. Del mismo modo, tanto los progenitores como los respectivos híbridos se pudieron separar en un dendrograma de

agrupamiento, demostrando la utilidad de los marcadores AFLP en el mejoramiento de *Polianthes*.

**Palabras Clave:** *Polianthes*; AFLP; Polimorfismo, mejoramiento genético.

**Abstract:** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers were used for the detection of interspecific and intergeneric hybrids of the genus *Polianthes*. Twenty intergeneric and interspecific hybrids were analyzed, 10 hybrids from *P. tuberosa* var. Double X *P. howardii* and 10 intergeneric hybrids from *P. geminiflora* var. Clivicola X *Prochnyanthes mexicana*, also two accessions from *Agave tequilana* Weber var. Azul. Six primer combinations *Eco* + 3 / *Mse* +3 were used, making a total of 290 bands of which 220 (75.65%) were polymorphic. The average of bands and level of polymorphism were 48.3 with 36.6% respectively. Combinations *Mse* + CAT / *Eco* ACT and *Mse* CTG / *Eco* ACT, were those with the highest number of fragments (bands 67 and 44 respectively) and also those with the highest percentage of polymorphic bands (52% and 38% respectively). Some fragments generated clearly corresponded to the parents, which were useful to confirm the hybrid status of individuals. Similarly, both the parents and their respective hybrids were separated on a dendrogram, showing the benefits of AFLP markers on *Polianthes* breeding.

**Keywords:** *Polianthes*; AFLP; Polymorphism, breeding

---

## 1. Introducción

El continuo incremento del mercado mundial de plantas ornamentales se traduce en una demanda sostenida de nuevas variedades y/o nuevas especies. Para competir a nivel mundial se requieren productos de calidad superior, flores en contraestación, variedades nuevas o especies únicas. A nivel internacional existe un creciente interés en la utilización y domesticación de especies ornamentales nativas y endémicas, principalmente para el mercado local y en algunos casos para la exportación [1].

El género *Polianthes* L. (Agavaceae), endémico de México, comprende aproximadamente 14 especies, de las cuales seis especies y tres formas se encuentran en el Estado de Jalisco. El principal uso del género es ornamental, representado para este fin por el Nardo (*Polianthes tuberosa* L.). El Nardo también es utilizado para la extracción de esencias para la elaboración de perfumes, y junto con *P. geminiflora* se utiliza como sustituto de jabón. *Polianthes geminiflora* es la especie con mayor distribución en el país, Sin embargo, poco se sabe de los niveles de diversidad genética existentes en esta especie [2]. Actualmente, el uso de herramientas biotecnológicas es cada vez más común en especies vegetales y en este sentido el uso de marcadores moleculares puede ayudar entre otras cosas a detectar niveles de diversidad genética tanto en especies silvestres como cultivadas así como en la confirmación de hibridaciones en etapas tempranas de desarrollo. En el centro de investigación y Asistencia en tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. se ha iniciado un programa de

mejoramiento genético de Nardo (*Polianthes tuberosa*) y después de un ciclo de cruzas interespecíficas e intergenéricas se tienen híbridos putativos F1 que actualmente se encuentran en crecimiento en invernadero para evaluar sus características [3]. Sin embargo, el tiempo necesario para que estos híbridos alcancen la madurez puede llevar hasta tres años, lo que implica tiempo y recursos para su manejo. Al no contar con una característica morfológica que nos pueda confirmar el estatus híbrido de estas líneas en etapas tempranas de desarrollo surge la necesidad de probar alternativas confiables para realizar esta actividad. El objetivo del presente trabajo es confirmar el estatus híbrido en líneas F1 interespecíficas (*Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii*) e intergenérica (*Polianthes geminiflora* var. Clivicola X *Prochnyanthes mexicana*) usando marcadores AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados).

## 2. Materiales y Métodos

El material vegetal consistió en hojas jóvenes y visiblemente sanas de 20 híbridos putativos F1, además de los sus progenitores así como dos individuos de *Agave tequilana* Weber var. Azul como controles externos.

**Extracción de ADN:** La extracción de ADN se realizó usando el método propuesto por [4] con algunas adaptaciones para el género, con una consecuente estimación de la concentración de ADN total con un gel de calidad de agarosa al 1.0 %; a la par con esta determinación se realizó la cuantificación de la concentración de ADN usando las relaciones de absorbancia con un Fluoroespectrómetro nanodrop Thermo Scientific.

**Análisis AFLP:** El análisis usando marcadores AFLP se realizó con base en la metodología propuesta por [5], que comprende los siguientes pasos:

**Digestión:** Se cortaron alrededor de 500 ng de ADN genómico en un volumen total de 50  $\mu$ L con dos enzimas de restricción, *Mse* I (invitrogene), *Eco* RI. Para confirmar la digestión se realizó un gel de calidad de agarosa al 1.0 % en cámara electroforética horizontal a 85 volts por 1 hora, y tinción con bromuro de etidio en un analizador de imágenes Gel-Doc XR de Bio-Rad.

**Ligación de adaptadores:** Una vez confirmada la digestión del ADN, se procedió a la ligación de los adaptadores a los extremos de los fragmentos generados. La secuencia de los adaptadores para la ligación de los cortes generados por *Eco* RI fue: 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3' y para *Mse* I 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'. **Preamplificación:** Se efectuó usando el ADN ligado y usando iniciadores complementarios a los adaptadores pero con una banda selectiva +1 (*Mse* + C y *Eco* + A). La secuencia de los iniciadores fue 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3' para *Mse*I, 5'GACTGCGTACCAATTCA 3' para *Eco* RI.

**Amplificación selectiva:** Para la amplificación se realizaron diferentes combinaciones de iniciadores *Eco* + 3 y *Mse* + 3 (ver Cuadro 1). Se verificó la amplificación selectiva con un gel de calidad de agarosa al 1.0 %.

**Electroforesis y tinción:** Los fragmento se separaron en geles de acrilamida al 6 % en una cámara de secuenciación (Sequi-Gen<sup>®</sup> GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell), donde se cargaron 5  $\mu$ L de la muestra por pozo, usando 1X búfer TBE (tris-borato-EDTA), a 50 Watts por 2 horas. Después de este

tiempo los cristales de la cámara fueron separados y los fragmentos se visualizaron por tinción con nitrato de plata usando el procedimiento descrito por Bassam y Caetano-Anolles [6].

Codificación de los fragmentos: Las bandas de AFLP fueron codificadas asignando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia; formando así, una matriz de código binario la cual se usó para calcular las distancias genéticas entre los híbridos y sus respectivos progenitores, mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis estadístico multivariado (MVSP), versión 3.1. (Copyright 1989-2001 Kovach Corporation Service). Para cada combinación de AFLP probada se evaluó la existencia de fragmentos en común de los progenitores con sus respectivos híbridos y se determinó cuál de estas combinaciones fue la de mayor utilidad para la confirmación de hibridación en los diferentes tipos de cruzamientos (interespecíficos y/o intergenéricos).

### **3. Resultados**

#### *Nivel de polimorfismo.*

Con las seis combinación de iniciadores utilizadas, se obtuvieron un total de 290 bandas de las cuales 220 (75.65%) fueron polimórficas. El promedio de bandas por combinación fue de 48.3 con un 36.6% de polimorfismo (Cuadro 1). En el análisis de bandas por combinación de iniciadores se encontró que las combinaciones *Mse* + *CAT/Eco* ACT y *Mse* *CTG/Eco* ACT, son aquellas con mayor número de fragmentos (67 y 44 bandas respectivamente) y a su vez mayor porcentaje de bandas polimórficas (52% y 38% respectivamente). Por lo que se puede decir que son las combinaciones que aportan mayor información.

**Cuadro 1.** Número de bandas y porcentaje de polimorfismo por cada iniciador.

No.	Combinación/ iniciador (Mse I/ Eco RI)	Número de bandas totales	Bandas polimórficas	% polimorfismo
1	CAG/ACG	40	31	77.5
2	CAG/ACT	30	21	70
3	CAT/ACG	61	45	73.7
4	CAT/ACT	67	52	77.6
5	CTG/ACG	48	33	68.75
6	CTG/ACT	44	38	86.36
total		290	220	75.65

El nivel de polimorfismo fue siempre mayor en los híbridos de *Polianthes tuberosa* var. Doble *X Polianthes howardii* independiente mente de la combinación de iniciadores empleada en relación con los híbridos de *Polianthes Geminiflora*. Var. Clivicola *X Prochnyanthes Mexicana* (Cuadro 2).

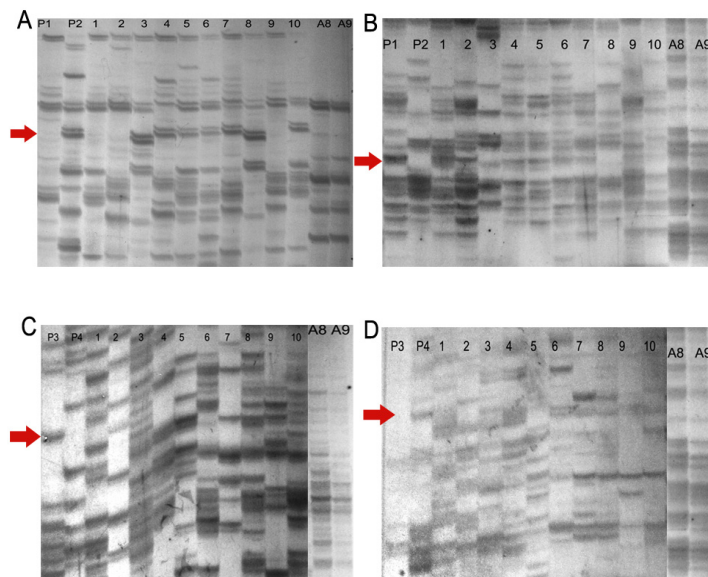
Las combinaciones con mayor porcentaje de polimorfismo para la cruce entre *Polianthes tuberosa* var. Doble *X Polianthes howardii* fueron Mse I +CAG/Eco RI+ACG y Mse I +CTG/Eco RI+ACT; mientras que, las que presentaron menor polimorfismo fueron las combinaciones: Mse I + CAG/Eco RI + ACT y Mse I + CAT/Eco RI + ACG. Para el caso de las cruces de los híbridos de *Polianthes Geminiflora*. Var. Clivicola *X Prochnyanthes Mexicana*, las combinaciones con mayor porcentaje polimórfico fueron: Mse I +CAT/Eco RI+ACT y Mse I +CTG/Eco RI+ACT; y las de menor porcentaje: Mse I +CAG/Eco RI+ACG y Mse I +CTG/Eco RI+ACG (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Número de bandas y Porcentaje de Polimorfismos por cada cruza

Combinación  (Mse I/ Eco RI)	Bandas totales	Bandas polimórficas		Porcentaje de polimorfismo	
		<i>Polianthes tuberosa</i> var. Doble X <i>Polianthes howardii</i>	<i>Polianthes Geminiflora.</i> Var. Clivicola X <i>Prochnyanthes Mexicana</i>	<i>Polianthes tuberosa</i> var. Doble X <i>Polianthes howardii</i>	<i>Polianthes Geminiflora.</i> Var. Clivicola X <i>Prochnyanthes Mexicana</i>
CAG/ACG	40	30	13	75.00	32.50
CAG/ACT	30	16	18	53.3	60.00
CAT/ACG	61	34	32	55.74	52.46
CAT/ACT	67	40	37	59.70	55.22
CTG/ACG	48	28	19	58.30	39.58
CTG/ACT	44	35	24	79.54	54.54
Total	290	183	143	63.59	49.05

De los fragmentos obtenidos con las diferentes combinaciones probadas, hubo algunos que se encontraron presentes en todos los individuos, tanto progenitores como híbridos (fragmentos monomórficos), los cuales no fueron útiles para el propósito de este estudio. Sin embargo, de los fragmentos polimórficos obtenidos, existieron algunos que notoriamente correspondían a solo uno de los progenitores y se encontraban en algunos de sus híbridos correspondientes, los cuales fueron de utilidad para confirmar la hibridación de estos, ya que indican que el material genético de los dos progenitores fue exitosamente incorporado en los híbridos (Figura 1).





**Figura 1.** Secciones de geles AFLP en donde se muestran fragmentos en común de los híbridos putativos con sus respectivos progenitores. A: Gel combinación CAG/ACG, B: Gel combinación CTG/ACT, se observan bandas exclusivas en híbridos de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii*, en la figura (A) se muestran fragmentos en común de la progenie híbrida respecto al progenitor P2, en la figura (B) fragmentos exclusivos para P1. [P1 (Progenitor *tuberosa*), P2 (Progenitor *howardii*), 1-10 (Híbridos F1 *Tuberosa X Howardii*), A8, A9 (Controles *Agave Tequilana* Wever var. Azul)]. C: Gel con combinación CTG/ACT, D: Gel combinación CAT/ACT, se observan bandas exclusivas para híbridos de *Polianthes Geminiflora* Var. Clivicola X *Prochnyanthes Mexicana*, en la figura (C) se muestran fragmentos en común de la progenie híbrida respecto al progenitor P3, en la figura (D) fragmentos exclusivos para P4. [P3 (Progenitor *Clivicola*), P4 (Progenitor *Prochnyanthes*), 1-10 (Híbridos F1 *Clivicola X Prochnyanthes*), A8, A9 (Controles *Agave Tequilana* Wever var. Azul)].

#### *Similaridad genética y análisis de coordenadas principales.*

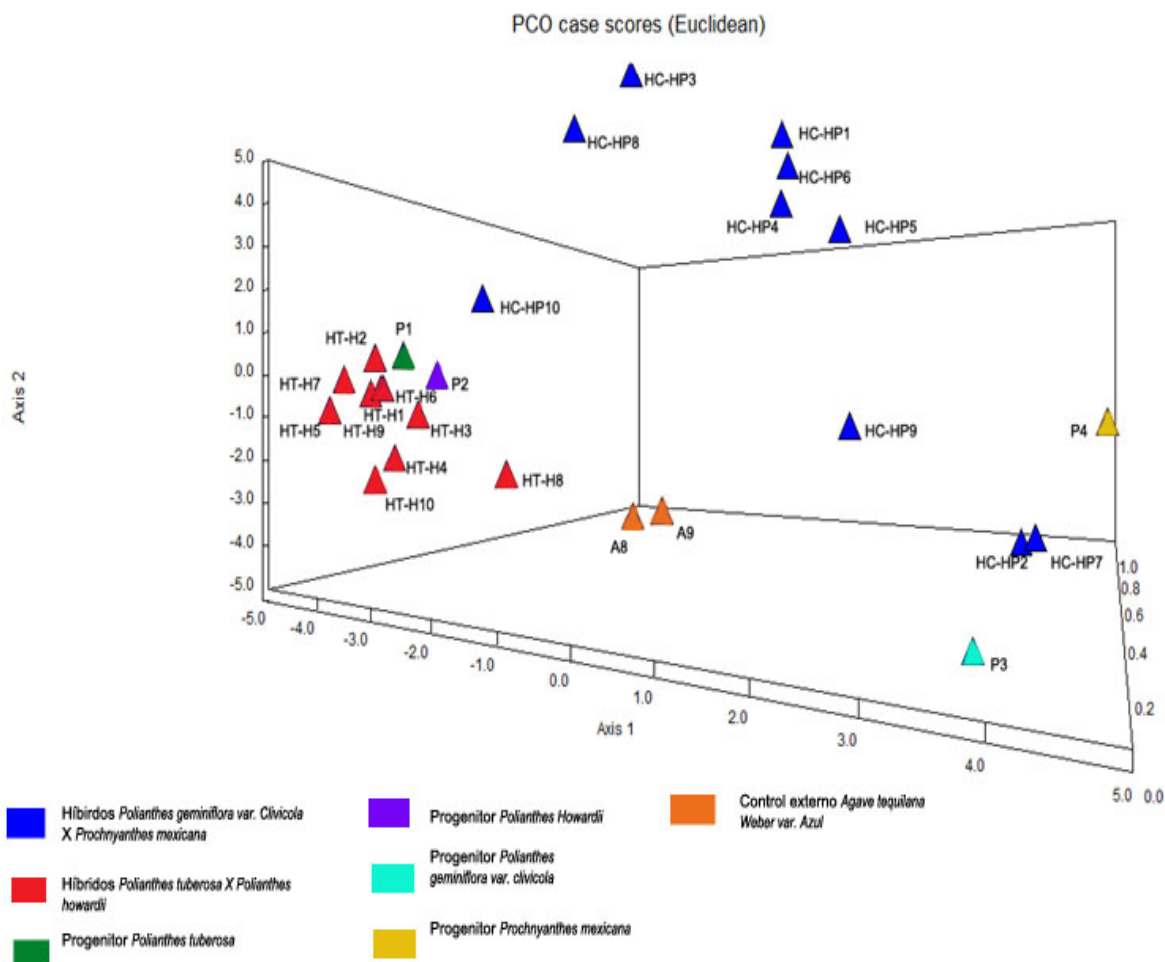
A partir de la matriz de similaridad (matriz no mostrada), se construyó el cuadro 3, en donde se muestra los valores de similaridad genética obtenidos por combinación y entre progenitores y sus respectivos híbridos. De esta manera el progenitor *Polianthes tuberosa*. Doble (P1) mostro un similaridad de 0.66 entre todas las combinaciones respecto a su progenie, mientras que para *Polianthes Howardii* (P2) arrojo una distancia de 0.65, lo cual señala que su progenie comparte características de ambos progenitores en una promedio casi idéntico. Para el caso de los híbridos de *Polianthes Geminiflora*. Var. Clivicola X *Prochnyanthes Mexicana*, para el progenitor *Polianthes geminiflora* var. Clivicola (P3) se calculó una distancia de 0.45 y para el progenitor *Prochnyanthes mexicana* (P4) una distancia de 0.47, el progenitor P4 mostro una similaridad mayor en la progenie híbrida.



**Cuadro 3.** Número de fragmentos y promedios de similaridad genética entre cada cruce y sus progenitores.

Combinación (Mse I/ Eco RI)	No. Fragmentos	Distancia Genética	Distancia genética entre los híbridos	Distancia genética a HC-HP	Distancia genética a HT-H	Distancia genética HC-HP, respecto a cada progenitor (Clivicola/Prochnyanthes)		Distancia genética HT-H, respecto a cada progenitor (Tuberosa/Howardii)	
CAG/ACG	40	0.40	0.38	0.26	0.41	0.26	0.30	0.63	0.61
CAG/ACT	30	0.61	0.63	0.63	0.8	0.63	0.66	0.77	0.80
CAT/ACG	61	0.46	0.5	0.48	0.56	0.48	0.51	0.58	0.57
CAT/ACT	67	0.60	0.57	0.55	0.60	0.555	0.554	0.67	0.66
CTG/ACG	48	0.36	0.37	0.31	0.52	0.30	0.34	0.55	0.52
CTG/ACT	44	0.60	0.60	0.51	0.65	0.52	0.55	0.75	0.74
Promedio de similaridad genética total	290	0.505	0.51	0.456	0.59	0.456	0.47	0.66	0.65

Para el análisis de coordenadas principales (ACP) se evaluaron 290 variables (fragmentos) de 26 casos (Figura 2). Se observa una distribución en donde se encuentran más relacionados los híbridos de *P. tuberosa* X *P. howardii* entre ellos incluso respecto a sus progenitores, debido a sus altos niveles de similaridad y el mayor número de fragmentos en común; por su parte, los híbridos de *P. geminiflorta* var. *Clivicola* x *Prochnyanthes mexicana* presentaron una distribución más heterogénea dentro del plano de coordenadas principales. Cabe mencionar que en este caso los híbridos HC-HP7 y HC-HP9, que en el dendrograma (Figura no mostrada) se observaron muy separados respecto al resto, en el plano en tres dimensiones estos se encuentran más relacionados con sus progenitores en relación con el resto de los híbridos.



**Figura 2.** Análisis de Coordenadas Principales (Coeficiente de káiser) de híbridos de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii* e híbridos de *Polianthes geminiflora* var. *Clivicola* X *Prochnyanthes mexicana*, con sus respectivos progenitores usando 6 combinaciones AFLP.

#### 4. Discusión

La cantidad de polimorfismos encontrados en las combinaciones de iniciadores evaluadas, se esperaba obtener una gran variabilidad debido a que los individuos analizados fueron híbridos. Como era de esperarse en el caso de los híbridos de *Polianthes Geminiflora* var. *Clivicola* X *Prochnyanthes mexicana* se obtuvo una mayor variabilidad debida a que se trató de cruzamientos intergenéricos, tanto *Polianthes*, como *Manfreda* y *Prochnyanthes*, son considerados géneros muy relacionados e incluso algunos autores coinciden en que deberían formar un solo género [7]. Sin embargo, el alto nivel de polimorfismo entre los progenitores y sus híbridos coincide en que existen mayores diferencias a nivel genético que en los cruzamientos interespecíficos de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii*, donde *Polianthes tuberosa* var. Doble es una especie comercial que pudiera presentar una menor heterocigósisis en sus alelos a diferencia de los progenitores *clivicola*, *Prochnyanthes* y *howardii* que son especies silvestres; por otro lado, tanto *P. tuberosa* como *P. howardii*, se observaron más relacionados respecto a los otros progenitores. Aunque la combinación de iniciadores con mayor número de bandas y porcentaje de polimorfismo, fue la combinación CTG-Mse /ACT-Eco con 44 bandas y

79.54 % de polimorfismo, es comparable con los datos de estudios anteriores. Por ejemplo, Nwakanma [8], Quienes realizaron un estudio de diversidad genética con marcadores AFLP de *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla de algunos de sus híbridos naturales, del cual obtuvieron 527 bandas polimórficas, usando 15 combinaciones de iniciadores AFLP, reportando una distancia genética promedio entre los 28 individuos evaluados de 61.3%; La distancia genética promedio entre los diploides de *M. acuminata* fue del 56.2%, mientras que en *M. balbisiana* fue del 29.5%. También se han realizado análisis de la variabilidad en *A. fourcroydes* con AFLP empleando 4 combinaciones de iniciadores obteniendo 364 bandas con 302 (83%) polimórficas. En 2003 utilizaron AFLP para identificar el nivel del ADN de *A. fourcroydes* utilizando 2 combinaciones, y obtuvieron 246 bandas y un bajo porcentaje 25.2% de polimorfismo[9]. Se ha evaluado la diversidad genética de 148 híbridos de naranja pera (*C. sinensis* X *L. Osbeck*) y Tangor “Murcott” (*Citrus reticulata* Blanco X *C. sinensis* L. Osbeck) por marcadores AFLP fluorescentes y RAPD. De sus resultados reportan que el 80 % de los híbridos fue más similar al progenitor femenino “naranja pera” y el 20 % al progenitor masculino “Murcott”, en el presente trabajo, también se encontró una similaridad más próxima de la progenie híbrida de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii*, respecto al progenitor femenino, no fue una diferencia tan significativa en comparación con este trabajo, esta proximidad genética puede ser debida a la herencia extranuclear [10].

## 5. Conclusiones

La técnica de AFLP fue útil para determinar la hibridación interespecífica e intergenérica en *Polianthes*. La combinación de iniciadores que dio mejores resultados en general fue la (CTG-Mse /ACT-Eco) con 44 bandas y 79.54 % de polimorfismo para los híbridos interespecíficos de *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii* y 54.54 % de polimorfismo para los híbridos intergenéricos de *Polianthes Geminiflora*. Var. Clivicola X *Prochnyanthes Mexicana*. Para el caso de híbridos *Polianthes tuberosa* var. Doble X *Polianthes howardii* la mejor combinación fue la CTG-Mse /ACT-Eco; mientras que, para los híbridos de *Polianthes Geminiflora*. Var. Clivicola X *Prochnyanthes Mexicana* la mejor combinación fue la 4 (CAT-Mse I/ACT-Eco RI). Por la rapidez de la técnica y la posibilidad de hacer el análisis en etapas tempranas de desarrollo de la planta, es factible el uso de marcadores AFLP en un programa de mejoramiento del Nardo.

## Agradecimientos

A Fomix Morelos MOR-2009-C02-120064, por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

## Referencias

- [1] Weiss, D. 2002. Introduction of new cut flower: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties. In: A. Vainstein (ed.). *Breeding for ornamentals: Classical and Molecular approaches*. Kluwer academic Netherlands 129-137.
- [2] R. Barba-Gonzalez, J.M. Rodríguez-Domínguez, M.C. Castañeda-Saucedo, A. Rodríguez, J.M. Van Tuyl, E. Tapia-Campos\*. 2012. Mexican geophytes I. The genus *Polianthes*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1): 122-128.
- [3] R. Barba-González, J.M. Rodríguez-Domínguez, De la Cruz-Cruz A., Lara-Bañuelos T.Y., M.C. Castañeda-Saucedo, E. Tapia-Campos\*. 2013. *Polianthes* breeding. *Acta Horticulturae*. 1000: 132-137.

- [4] Saghai-Marooof, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Medelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics, 81: 8014- 8018.
- [5] Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- [6] Caetano-Anollés G, Gresshoff P.M. (1994). Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. Institute of Agriculture and Center for Legume Research. *The University of Tennessee Knoxville, Promega Notes Magazine*, 45: 13.
- [7] Eguiarte L, Souza V, Silva-Montellano A, (2000), Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66: 131-150.
- [8] Nwakanma D., G. Ude, M. Pillay, A. Tenkouano. (2002). *Genetic Diversity in Musa acuminata Colla and Musa balbisiana Colla and some of their natural hybrids using AFLP markers*. International Institute of Tropical Agriculture, Oyo Road, Ibadan, Nigeria, Springer-Verlag, Pág: 1-7.
- [9] Infante D., G. González, L. Peraza-Echeverría y M. Keb-Llanes, (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*. 164: 223-230.
- [10] Bastianel Marinês, Antonio Carlos de Oliveira, Mariângela Cristofani, Marcos Antônio Machado, (2005). Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor ‘Murcott’ avaliada por fAFLP e RAPD. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 41(5): 779-78.