

Diversidad genética de genotipos partenocarpicos arbustivos de calabaza mediante marcadores genéticos moleculares

Alonso Méndez-López^{1§}
Clemente Villanueva-Verduzco¹
Reyna Isabel Rojas-Martínez²
Jaime Sahagún-Castellanos¹
M. Teresa Colinas-León¹
Miriam Sánchez-Vega³

¹Departamento de Fitotecnia-Instituto de Horticultura-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco km 38.5. Chapingo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (clemente@correo.chapingo.mx; jsahagunc@yahoo.com.mx; lozcol@gmail.com). ²Campus Montecillo-Colegio de Posgraduados. Carretera México- Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. (rojas@colpos.mx). ³CONACYT-UAAAN. Calzada Antonio Narro núm. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (mirisanve@gmail.com).

§Autor para correspondencia: alonso1977@gmail.com.

Resumen

La producción de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) para verdura o calabacita bajo cubierta presenta dificultades por la falta de polinización, por tal razón, la partenocarpia es una alternativa para generar variedades de calabacita de invernadero, por lo que actualmente se realizan esfuerzos en la búsqueda de partenocarpia genética que no requiera del estímulo de la polinización, ni por factores fisiológicos a fin de que el fruto se desarrolle en forma normal hasta la madurez fisiológica. Se estudiaron molecularmente 46 genotipos partenocarpicos de calabaza arbustiva tipo round zucchini obtenidos en la Universidad Autónoma Chapingo. El objetivo fue caracterizar e identificar la diversidad genética entre los genotipos a partir de la variabilidad obtenida mediante marcadores genéticos moleculares como los microsatélites del tipo ISSR (inter secuencias simples repetidas) y RAMP (polimorfismo de microsatélites amplificados al azar). Se utilizó (GATA)₄ como iniciador de ISSR y la combinación de (GATA)₄ con cuatro iniciadores de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (OPA05, OPA10, OPA13 Y OPA19) para RAMP. Con las dos técnicas se obtuvo un total de 43 *loci* polimórficos, seis *loci* amplificaron con ISSR y 37 *loci* con RAMP. El porcentaje de *loci* polimórficos para ISSR fue de 100%, mientras que para RAMP fue de 91.8% de polimorfismo, se encontró alto grado de relación genética entre los genotipos partenocarpicos. Se formaron cinco grupos para ISSR y cuatro para RAMP, con distancias génicas entre 0.72 a 1.

Palabras clave: *Cucurbita pepo* L., análisis genético, microsatélites, RAMP.

Recibido: noviembre de 2018

Aceptado: enero de 2019

Introducción

La diversidad genética de las especies de *Cucurbita* spp. en México es amplia, una de las especies de este género de mayor importancia económica a nivel mundial es *Cucurbita pepo* L., presenta variación tanto intra como inter específica en diferentes tipos de caracteres y de los que más se tienen reportes es en aspectos morfológicos (Méndez *et al.*, 2010). La importancia de la calabaza se debe a su contenido de sustancias nutritivas y a las cualidades gustativas de su fruto, el cual se consume como verdura o madura (Villanueva, 2007). La producción de calabaza para verdura o calabacita bajo cubierta presenta dificultades por la falta de polinización; sin embargo, es una alternativa económica importante y factible de desarrollarse (Manzano *et al.*, 2010).

Actualmente, conociendo la importancia de la partenocarpia para variedades de calabacita de invernadero, se realizan esfuerzos en la búsqueda de partenocarpia genéticamente determinada que no requiera del estímulo de la polinización, ni por factores fisiológicos a fin de que el fruto se desarrolle en forma normal hasta la madurez (Martínez *et al.*, 2013).

La caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el uso de caracteres morfológicos y agronómicos. Sin embargo, este método presenta restricciones, ya que su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, por lo que, los métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores genéticos moleculares, han demostrado ser más eficientes y en la mayoría de los casos, superan las limitaciones de los métodos tradicionales, éstos marcadores proveen una herramienta valiosa para establecer una precisa genotipificación de cultivares y son utilizados internacionalmente con estos fines (Azofeifa, 2006).

El surgimiento y uso de los marcadores genéticos moleculares dieron nueva dimensión a los estudios de diversidad genética, con ventajas sobre otros tipos de marcadores al no ser afectados por el ambiente y por lo general son selectivamente neutros, por lo tanto, evolucionan en su mayoría como resultado de mutaciones (Rajwant *et al.*, 2011).

Con base en el contexto anterior el objetivo del presente estudio fue identificar la diversidad genética por medio de marcadores moleculares ISSR (inter secuencias simples repetidas) y RAMP (amplificación al azar del polimorfismo de microsatélites: combinación de RAPD (polimorfismos en el ADN amplificado al azar) + ISSR) en genotipos partenocarpicos de calabaza arbustiva tipo round zucchini.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se seleccionó el material vegetal de una población de amplia base genética de plantas partenocarpicas de calabaza arbustiva, 46 genotipos provenientes de la libre recombinación de progenies con cruzamiento dialélico (método IV de 1989), de siete variedades experimentales tipo round zucchini. Dicha población fue desarrollada *ex profeso* en el Programa de Mejoramiento Genético del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

Análisis molecular

El análisis molecular se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno (FPP) en el Colegio de Postgraduados, México. Se extrajo el ADN genómico de 46 genotipos, a partir de hojas jóvenes, sanas y liofilizadas con el protocolo modificado por Rojas *et al.* (2003), conocido como método combinado: MLO y CTAB 3%.

La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2% (p/v) teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}) y por medio de un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen (NanoDrop ND-1000 V3.7 de Thermo Scientific®) se determinó la absorbancia (260/280) en un rango de 1.33 a 1.94, la concentración del ADN fue de $202.3\text{-}512.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo para la ISSR con un iniciador (GATA)₄ y para RAMP se utilizaron cuatro iniciadores de secuencia aleatoria de la serie A de Operon (OPA: 05, 10, 13, 19) combinados con (GATA)₄, estos iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los iniciadores seleccionados son el resultado de la estandarización del protocolo y fueron los que presentaron polimorfismo y marcaron diferencias considerables en el bandeo, entre los genotipos.

El volumen y la concentración de cada reactivo en la mezcla de reacción para la PCR, se ajustó a $25 \mu\text{L}$ como volumen final, la cual contuvo: $2.5 \mu\text{L}$ de Buffer [10 X], $1.5 \mu\text{L}$ de MgCl_2 , [$30 \text{ Mm } \mu\text{L}^{-1}$], $0.5 \mu\text{L}$ de Dntp's [$2.5 \text{ Mm } \mu\text{L}^{-1}$], $2 \mu\text{L}$ de (GATA)₄ [$10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$], $0.2 \mu\text{L}$ de Taq ADN-polimerasa (Amplificasa®) [$5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$], $4 \mu\text{L}$ de ADN genómico [$20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$] y $14.05 \mu\text{L}$ de agua desionizada estéril, para el caso de ISSR, mientras que para RAMP, se adicionó $2 \mu\text{L}$ de cada iniciador aleatorio por reacción (OPA05, OPA10, OPA13 y OPA19) [$10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$] y el agua se ajustó a $12.05 \mu\text{L}$, las combinaciones de cada RAMP quedaron de la siguiente manera: OPA05+(GATA)₄, OPA10+(GATA)₄, OPA13+(GATA)₄ y OPA19+(GATA)₄. El ADN se colocó de manera individual a cada tubo según el número de genotipo de calabaza a caracterizar.

Se utilizó un termociclador APOLO® (Instrumentation ATC 201, serie 00449), las condiciones de termociclaje para ISSR consistieron de un ciclo de predesnaturalización de 1 min a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 40 ciclos de 40 s a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$, seguidos de un ciclo de 8 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ y un periodo a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ de extensión final, mientras que para RAMP las condiciones consistieron de un ciclo de predesnaturalización de 2 min a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 35 ciclos de 1 min a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y 3 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$, seguidos de un ciclo de 10 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ y un periodo de extensión final a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los productos de amplificación obtenidos de los ISSR y RAMP se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% (p/v) a 85 volts, durante un periodo de 4.5 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador (modelo Gel Doc 2000, BIO RAD®), la foto del gel se capturó con el programa Quantity One 4.0.3. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen®) en ambos costados del gel de agarosa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en forma separada para cada una de las técnicas moleculares. En el análisis de conglomerados se calcularon las distancias genéticas con el coeficiente de apareamiento simple, Sokal y Sneath, (1963) y se obtuvo un dendrograma de similaridad por medio

del método del promedio aritmético no ponderado por pares entre agrupamientos, tipo UPGMA (Adams *et al.*, 2000). La robustez se probó por medio de 1 000 remuestreos en las matrices de distancias genéticas con un $\alpha=0.05$, la confiabilidad de los resultados se verificó por medio de una prueba de Mantel (1967). Como parámetros de diversidad genética se consideraron: el porcentaje de *loci* polimórfico y el rango de polimorfismo en pares de bases (pb), las distancias genéticas de similitud y el rango de distancias genéticas (RDG) entre grupos y genotipos. Se utilizó el paquete computacional de NTSYSpc versión 2.21 h (Rohlf, 2009).

Resultados y discusión

Análisis del polimorfismo

Se produjo un total de seis *loci* amplificados, los cuales representaron el 100% del polimorfismo generado por el iniciador (GATA)₄ utilizado para los ISSR y con un rango del peso molecular en la amplificación de *loci* polimórficos de 506 a 1 636 pb (Cuadro 1). Éstos resultados indican que los genotipos partenocarpicos de calabaza tienen poca diferenciación genética, por el bajo número de *loci* detectados con los ISSR; al respecto, Vigoroux *et al.* (2002) menciona que las especies cultivadas han experimentado una fuerte presión de selección dirigida a genes que controlan algunas regiones genómicas, mientras que los genes que no tienen presión de selección mantienen similitud con sus parientes silvestre, la selección que el ser humano ha realizado a las especies cultivadas durante su domesticación y su mejoramiento genético ha reducido la variación en exceso sobre todo en los genes para los que dicha especie poseía variación alélica, mientras que otros *loci* experimentan modificación de la diversidad acorde con el efecto natural, en este sentido Restrepo y Vallejo (2008), en un trabajo con colectas de *Cucurbita moshata* y con marcadores polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), mencionan que los niveles de variación genética o heterocigosidad más altos se debe a la distancia entre poblaciones y a los intercambios antrópicos que se da en esta especie.

Cuadro 1. Número de *loci* amplificados por el iniciador de ISSR y para RAMP en 46 genotipos partenocarpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	P. amplificados		Polimorfismo (%)	<i>loci</i> monomórficos (%)	Rpm (pb) de <i>loci</i>
		Tts	Plmfcs			
Microsatélites (ISSR)						
(GATA) ₄	GATAGATAGATAGATA	6	6	100	0	1636-506
RAMP (RAPD + ISSR)						
OPA05	AGGGGTCCTG + GATAGATAGATAGATA	7	7	100	0	1018-298
OPA10	GTGATCGCAG + GATAGATAGATAGATA	8	6	75	25	3054-506
OPA13	CAGCACCCAC + GATAGATAGATAGATA	12	11	91.7	8.3	3054-506
OPA19	CAAACGTCGG + GATAGATAGATAGATA	10	10	100	0	2036-396
Promedio		37	34	91.8	8.2	

Tts= totales; Plmfcs= polimórficos; Rpm= rango de peso molecular; pb= pares de bases.

Pradeep (2002) menciona que los ISSR frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción y permiten detectar el polimorfismo entre individuos de la misma población, evaluación de diversidad genética, así como distinción e identificación de variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica), entre otras.

Para RAMP, 34 *loci* de 37 totales amplificados fueron polimórficos lo que representa 91.8% y con un promedio de 8.5 *loci* por iniciador. El rango de amplificación se ubicó entre los 298 y 3 054 pb. Las combinaciones en las que se identificó menor variabilidad genética entre los genotipos fue con las combinaciones OPA10+(GATA)₄ y OPA13+(GATA)₄ con 25% y 8.3% de *loci* monomórficos, respectivamente (Cuadro 1), Wu *et al.* (1994) reportaron entre 10 a 20 de polimorfismo por iniciador en geles de acrilamida en ecotipos de *Arabidopsis* usando la técnica RAMP, lo que superó las expectativas del uso de esta técnica con respecto a otras alternativas, además de que favorece principalmente la amplificación de los microsatélites, sin excluir la amplificación de RAPD.

Valadez-Moctezuma *et al.* (2005), mencionan que con la técnica RAMP es posible identificar perfiles nuevos que comparten algunos fragmentos, de los perfiles obtenidos independientemente con las técnicas RAPD y microsatélites, además indican que los análisis RAMP proporcionan una nueva alternativa para analizar y hacer estudios de diversidad genética prácticamente en cualquier genoma; estos resultados respaldan ésta investigación debido a que se corroboran las diferencias encontradas entre el polimorfismo de ISSR, con respecto a RAMP, en los genotipos partenocarpicos de calabaza, por lo que resulto ser muy informativa la técnica de RAMP.

Análisis de agrupamiento

El árbol consenso o dendrograma de distancias genéticas de similaridad, obtenido de la robustez de los agrupamientos por 1 000 remueos generó cinco grupos con ISSR y cuatro grupos con RAMP. Estos grupos fueron definidos principalmente por la variabilidad genética que existe entre los genotipos (Figura 1 y 2), Méndez *et al.* (2010) en un trabajo previo caracterizaron los mismos genotipos partenocarpicos, con variables morfológicas y agronómicas, en el cual encontraron tres agrupaciones.

Los grupos obtenidos en el dendrograma para ISSR muestran a los genotipos 3, 15, 16, 20, 25, 28, 33, 38, 47, 51, 82, 84, 97, 103, 106 y 107 en el grupo I, con un RDG de 0.781 a 1, el grupo II lo integran los genotipos 5, 13, 14, 21, 30, 35, 45, 48, 62, 63, 70, 90, 91 y 105 (RDG de 0.802 a 1), en tanto que el grupo III está integrado por los genotipos 19, 26, 29, 41, 44, 56, 57, 87, 93 y 108 (RGD: 0.849 a 1), el grupo IV lo conforman los genotipos 23, 69 y 88 con similitud genética de 1, mientras que el grupo V lo integran los genotipos 73, 83 y 96, este grupo se encontró a mayor distancia genética con respecto a los otros grupos (0.469), el RDG entre los genotipos fue de 0.761 a 0.849 (Figura 1).

Estos resultados muestran concordancia con Méndez *et al.* (2010), por lo que los agrupamientos formados con ISSR presentaron las características siguientes: el grupo I está definido por plantas con entrenudos largos, frutos redondos de peso intermedio, cáscara delgada, mucha semilla y pequeña, en los grupos II y V, predominan plantas con entrenudos cortos, frutos alargados con bajo peso, cáscara delgada, poca semilla y pequeña. El grupo IV presenta plantas con entrenudos intermedios, frutos redondos, pesados, cáscara gruesa, mucha semilla y grande.

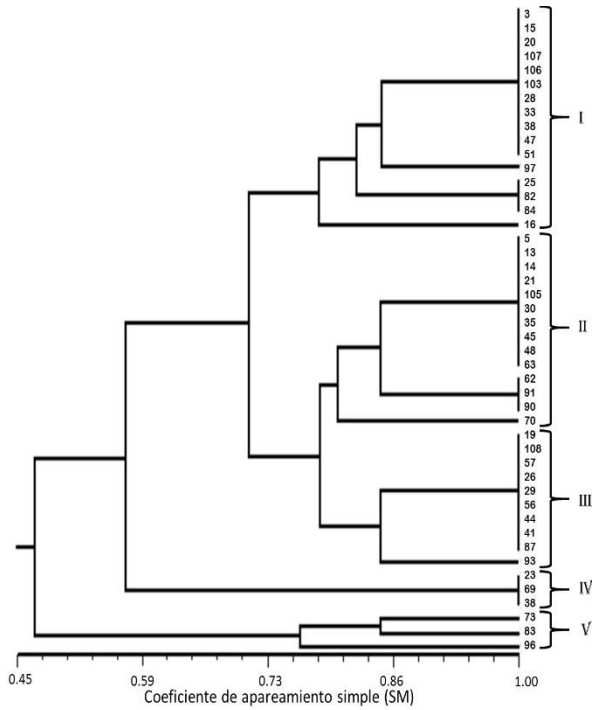


Figura 1. Dendrograma promedio construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM) de los productos amplificados de ISSR (GATA)₄ para 46 genotipos partenocarpicos de calabaza.

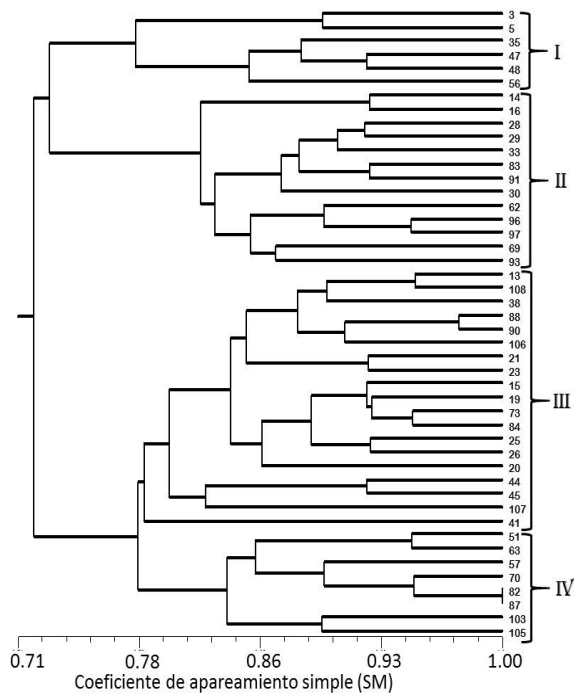


Figura 2. Dendrograma general construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo, mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM) de los productos amplificados de RAMP (OPA05, 10, 13 y 19) + (GATA)₄ para 46 genotipos partenocarpicos de calabaza.

En tanto que, con los resultados obtenidos con RAMP los grupos se conformaron de la siguiente manera: grupo I, genotipos 3, 5, 35, 47, 48 y 56, RDG de 0.729 a 0.919, grupo II conformado por los genotipos 14, 16, 28, 29, 30, 33, 62, 69, 83, 91, 93, 96 y 97, RDG de 0.720 a 0.945, grupo III integrado por 13, 15, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 38, 41, 44, 45, 73, 84, 88, 90, 106, 107 y 108, RDG de 0.782 a 0.974 y grupo IV con los genotipos 51, 57, 63, 70, 82, 87, 103 y 105, este último grupo contiene los genotipos más emparentados genéticamente (RDG: 0.8352 a 1) (Figura 2). Las características morfoagronómicas que reportan Méndez *et al.* (2010) para estos genotipos, se definen de la siguiente manera: para los grupos I y II, predominan plantas con entrenudos cortos, frutos alargados con bajo peso, cáscara delgada, poca semilla y pequeña. En el grupo III, prevalecen plantas con entrenudos largos, frutos redondos de peso intermedio, cáscara delgada, mucha semilla y pequeña.

El grupo III y IV (ISSR y RAMP, respectivamente), no presentaron predominancia de algunas características morfológicas y agronómicas entre los genotipos. En este sentido, Demey *et al.* (2008), demostraron que las caracterizaciones generadas por descriptores morfológicos de las hechas por marcadores moleculares, suelen ser independientes respondiendo en cada caso a reglas y presiones evolutivas diferentes.

Los grupos formados en RAMP presentaron mayor estabilidad que las agrupaciones que arrojo el análisis de los ISSR, además hubo mayor número de concordancias con las agrupaciones presentadas por Méndez *et al.* (2010), por lo que las relaciones encontradas con los marcadores moleculares empleados en este trabajo indican la condición genética en la que se encuentran los genotipos de calabaza para su futuro uso en el mejoramiento y búsqueda de partenocarpia. Sin embargo, Sánchez *et al.* (2000), mencionan que los estudios con marcadores moleculares no están asociados con diferenciación fenotípica y a la forma en la que se ha realizado el mejoramiento empírico y científico.

Demey *et al.* (2008) en trabajos de maíz, han sugerido conjuntar información de diferente índole para análisis de diversidad pues permite analizar toda la variabilidad y obtener un análisis más preciso, mejor distribución y definición de la clasificación de las poblaciones y la resolución de los resultados es mejor.

Los resultados de la comparación entre matrices de distancias genéticas sin remuestreo y la matriz promedio de 1 000 remuestreos, tanto para ISSR como para RAMP fueron corroborados con la prueba de Mantel (1967), misma que identificó correlación alta, positiva y significativa, para ambas técnicas moleculares ($r= 0.999$), con 99.9% de congruencia entre las distancias genéticas y las agrupaciones de los genotipos, al respecto Beyene *et al.* (2005), mencionan que correlaciones significativas indican que los conjuntos de datos reflejan el mismo patrón de diversidad genética y validan el uso de estos datos para realizar análisis estadísticos de diferentes tipos, como conglomerados sobre diferentes poblaciones.

Conclusiones

Se confirmó que existe diversidad genética entre los 46 genotipos partenocarpicos de calabaza tipo round zucchini, por medio de marcadores genéticos ISSR y RAMP.

El marcador molecular ISSR, con (GATA)₄ amplificó seis *loci* con 100% de polimorfismo; mientras que la combinación de (GATA)₄ y cada uno de los decámeros de Operon (OPA05, OPA10, OPA13 y OPA19) en la técnica RAMP, amplificaron 37 *loci* totales con 91.8% de polimorfismo.

Las distancias génicas entre los genotipos fueron muy cercanas a uno (0.72 a 1), por lo que se identificó emparentamiento genético entre los genotipos partenocarpicos de calabazas estudiados, con cinco grupos para ISSR y cuatro para RAMP.

Las técnicas moleculares ISSR y RAMP, empleadas en este estudio, fueron apropiadas para la caracterización de la diversidad genética de los genotipos partenocarpicos de calabaza y confirmo la diversidad que se reporta en la literatura.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado y a la Universidad Autónoma Chapingo, por todas las facilidades para el desarrollo de la presente investigación.

Literatura citada

- Adams, D.; Kim, J.; Jensen, R.; Les, M.; Slice, E. D. and Walker, J. 2000. NTSYpc. Versión 2.02. Applied biostatistics Inc.
- Azofeita, D. A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Revisión bibliográfica. Agron. Mesoam. 17(2):221-242. <https://www.redalyc.org/html/437/43717210/>.
- Beyene, Y.; Botha, M. A. and Myburg, A. A. 2005. A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. Afr. J. Biotechnol. 4(7):586-595. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2005.000-3107>.
- Demey, J. R.; Vicente, V. J. L.; Galindon, V. P. M. and Zambrano Y. A. 2008. Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by external logistic biplots. Bioinformatics. 24:2832-2838.
- Griffing, B. 1989. Genetics analysis of plants mixture. Genetics. 122(4):943-956. <http://www.genetics.org/content/122/4/943.short>.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27(2):209-220. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2.Part-1/209.full-text.pdf>.
- Manzano, S.; Marcos, S.; Martínez, C.; Megías, Z.; Mazet, J. y Jamilena, M. 2010. Producción de etileno y partenocarpia en calabacín. Actas Hort. 55:203-204. <http://www.sech.info/ACTAS/Acta%20n%C2%BA%2055.%20V%20Congreso%20de%20Mejora%20Gen%C3%A9tica%20de%20Plantas/Cap%C3%ADulo%20V.%20Otras%20Hort%C3%ADcolas/Producci%C3%B3n%20de%20etileno%20y%20partenocarpia%20en%20calabac%C3%ADn.pdf>.

- Martínez, C.; Manzano, S.; Megías, Z.; Garrido, D.; Picó, B. and Jamilena, M. 2013. Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BioMed Central Plant Biology*. 13(1):139-152. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-139>.
- Méndez, L. A.; Villanueva, V. C.; Sahagún, C. J.; Avítia, G. E.; Colinas, L. T.; Jamilena, Q. M. y Rojas, M. R. I. 2010. Obtención, caracterización y agrupamiento de genotipos partenocarpicos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) tipo 'round zucchini'. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 16(2):123-131.
- Pradeep, R.; Sarla, N. and Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128(1):9-17.
- Rajwant, K. K.; Manoj, K. R.; Sanjay, K.; Rohtas, S. and Dhawan K. A. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177(3):309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.
- Restrepo, S. A. J. y Vallejo, C. A. F. 2007. Caracterización molecular de introducciones colombianas de zapallo *Cucurbita moschata*. *Acta Agron*. 57(1):9-17.
- Rohlf, F. J. 2002. NTSYS pc: numerical taxonomy system. Version 2.1. Exeter Software. Setauket, New York. USA. 38 p. <https://www.exetersoftware.com/downloads/ntsysguide21.pdf>.
- Rojas, M. R. I.; Zavaleta, M. E.; Lee, M. I.; Martini, M. and Aspiroz, H. S. 2003. Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody in Mexico. *J. Plant Pathol*. 85(2):81-86.
- Sánchez, G. J. J.; Goodman, M. M. and Stuber, C. W. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ. Bot*. 54(1):43-59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>.
- Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A. 1963. Principles of numerical taxonomy. San Francisco, California: W. H. Freeman and Company. 359 p. <https://doi.org/10.2307/sysbio/13.1-4.106>.
- Valadez, M. E.; Kahl, G.; Rubluo, I. A. y Arreguin, de los M. R. 2005. Optimización de las huellas de ADN con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*. 11(2):351-356.
- Vigouroux, Y.; McMullen, M.; Hittinger, T. C.; Houchins, K.; Schulz, L.; Kresovich, S.; Matsuoka, J. and Doebley, J. 2002. Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(15):9650-9655. <https://doi.org/10.1073/pnas.112324299>.
- Villanueva, V. C. 2007. Calabazas cultivadas: identificación de especies, caracterización y descripción varietal. Texcoco, México. (Ed.). Universidad Autónoma Chapingo. 123 p.
- Wu, K.; Jones, R.; Danneberger, L. and Scolnik, P. A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res*. 22(15):3257-3258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310310/pdf/nar00039-0403.pdf>.