




Artículo Científico. Revisión

Evaluación de pureza varietal de lotes de semilla con marcadores genéticos: Revisión de investigaciones realizadas en Venezuela

Evaluation of varietal purity of seed lots with genetic markers: Review of research carried out in Venezuela

Mario D. Santella Quintero^{1*} , Catalina M. Ramis Jaumes² y Margaret Gutiérrez Mulas³

¹ Gerente de Producción, Departamento de Producción, Semillas Híbridas de Venezuela C. A. (SEHIVECA), Zona Industrial Corinsa. Cagua, Venezuela. ² Profesor Titular, Departamento de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV) - Campus Maracay. Avenida Universidad, vía El Limón. Código Postal: 2105. Maracay, Venezuela. ³ Gerente General, Semillas Híbridas de Venezuela C.A. (SEHIVECA), Zona Industrial Corinsa. Cagua, Venezuela.

*Correo electrónico: santellamariodaniel@gmail.com

Recibido: 11-06-2024. Aceptado: 28-11-2024. Publicado: 29-12-2024.

Resumen

Se presenta una compilación de trabajos de investigación realizados en Venezuela, que incorporan el uso de marcadores genéticos como técnica altamente confiable para la determinación de la pureza genética de lotes de semilla. En el proceso de certificación de semillas se deben cumplir cuatro preceptos de calidad, siendo la pureza varietal uno de los más importantes, ya que se refiere a la conservación de la identidad genética del material vegetal. Desde comienzos del siglo XXI, se han reportado trabajos que han incorporado el uso de isoenzimas y otros marcadores genéticos, logrando diferenciar cultivares de arroz. Igualmente, se han utilizado marcadores moleculares microsatélites para determinar la pureza de semilla genética de cultivares de algodón. Todos los trabajos citados confirman la confiabilidad de estas herramientas biotecnológicas para el tema en estudio; siendo el arroz el cultivo con mayor número de trabajos publicados. Con la información obtenida de estos trabajos, se podrá establecer un protocolo específico para evaluar la pureza genética de lotes de semilla de caraota (*Phaseolus vulgaris*

L.), el cual es inexistente y es de suma importancia dada la escasa disponibilidad de semilla certificada de esta leguminosa y al alto grado de impureza y mezcla varietal de los lotes con fines de multiplicación, por lo general, como consecuencia del inadecuado manejo que se le ha proporcionado a los mismos.

Palabras clave: Marcador genético, microsatélites, isoenzimas, pureza, calidad genética, *Phaseolus vulgaris* L.

Abstract

A compilation of research works carried out in Venezuela is presented, which incorporate the use of genetic markers as a highly reliable technique for determining the genetic purity of seed lots. In the seed certification process, four quality precepts must be met, with varietal purity being one of the most important, since it refers to the conservation of the genetic identity of plant material. Since the beginning of the 21st century, works have been reported that have incorporated the use of isoenzymes and other genetic markers, mana-



ging to differentiate rice cultivars. Likewise, microsatellite molecular markers have been used to determine the genetic purity of cotton cultivars. All the cited works confirm the reliability of these biotechnological tools for the subject under study; rice being the crop with the greatest number of published works. With the information obtained from these works, a specific protocol can be established to evaluate the genetic purity of batches of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds, which is non-existent and is of utmost importance given the limited availability of certified seed of this legume and the high degree of impurity and varietal mixing of the batches for multiplication purposes, generally as a consequence of the inadequate management that has been provided to them.

Keywords: Genetic marker, microsatellites, isoenzymes, purity, genetic quality, *Phaseolus vulgaris* L.

Introducción

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de alto consumo entre los venezolanos, constituye la principal fuente de proteína de origen vegetal y está arraigado en sus tradiciones ya que forma parte importante de su plato nacional. Aunque no se dispone de cifras oficiales, según información propia, se estima que el consumo per cápita actual se encuentra entre 4 y 6 kg.persona⁻¹.año⁻¹, razón por la cual se hace necesario un constante proceso de producción de granos para consumo, cuya principal limitante es la escasa disponibilidad de semilla certificada y una alta tasa de mezcla o pérdida de pureza de los lotes destinados para su multiplicación; lo que dificulta el trabajo de las empresas semilleristas que deben garantizar productos que cumplan con todos los requerimientos de ley.

La calidad de la semilla se basa en cuatro componentes, a saber: fisiológico, que se refiere a la capacidad de germinación y vigor; sanitario, que esté libre de plagas y enfermedades; físico, que no contenga mezclas

con impurezas o semilla dañada y, el genético, que mantenga la identidad varietal y características biológicas (Ley de Semillas, 2015; Flores *et al.*, 2016). De todos estos, el componente genético es de suma importancia ya que está directamente asociado a los preceptos que todo cultivar debe cumplir, según las normas del Instituto Internacional para el Análisis de Semilla (International Seed Testing Association [ISTA], 2024) y la International Convention for the Protection of New Varieties of Plants (ICPNVP, 1961), que son distinguibilidad, uniformidad y estabilidad.

Generalmente, la pureza genética se evalúa con los descriptores morfológicos del cultivar, técnica que resulta de poca eficiencia y credibilidad por la alta sensibilidad que poseen ante las condiciones ambientales (Márquez, 2003; Onamu *et al.*, 2012). No obstante, han surgido nuevas técnicas, como los marcadores moleculares, que son una herramienta útil para evaluar también la diversidad genética, ya que revelan polimorfismo a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN) y resultan un método más directo y confiable que los descriptores morfológicos, principalmente porque no están influenciados por el ambiente, pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta y se encuentran en todo el ADN del individuo (Solis Ramos y Andrade Torres, 2005).

Desde finales del siglo XX, el avance de la biotecnología ha sido constante y muy acelerado. Han surgido diferentes técnicas que permiten obtener resultados más confiables, precisos y rápidos. Además, se han logrado grandes avances en el sector agrícola que incluyen mejoras en la absorción de nutrientes, uso de microorganismos con propiedades promotoras del crecimiento vegetal, control de plagas con el uso de extractos y fermentos de plantas y hongos, entre otros (HEROGRA Especiales, 2022).

Asimismo, se han desarrollado marcadores genéticos que han evolucionado y permitido realizar estudios ba-



sados en el ADN de las plantas a las que ya se ha secuenciado su genoma. El uso de estos marcadores ha sido de gran ayuda para medir la magnitud de la variación a nivel genético dentro de las poblaciones y entre ellas, siendo posible diseñar las respectivas actividades de conservación genética y crear poblaciones útiles para la reproducción de cultivos, animales, árboles y peces. Estudios realizados aplicando estas técnicas a peces y especies arbóreas forestales han revelado altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones y entre ellas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2004).

Estos marcadores ofrecen una serie de ventajas sobre otros métodos para la evaluación de la pureza de la semilla. Son rápidos, precisos y relativamente económicos, y permiten detectar incluso pequeñas cantidades de contaminación genética. Su análisis es muy eficiente y facilita su implementación a gran escala, además de que pueden utilizarse para evaluar la pureza de semillas de cualquier especie (Tibihica *et al.*, 2019). Sin embargo, también tienen algunas desventajas como que pueden ser difíciles de interpretar, especialmente en muestras con una alta proporción de semillas impuras y pueden ser sensibles a la contaminación ambiental en el procedimiento.

Un término muy discutible es el de “marcador molecular”; ya que para algunos autores sólo los ácidos nucleicos deberían ser incluidos en esa categoría, mientras que otros incluyen también sus productos primarios, las proteínas, y distinguen entre marcadores proteicos (isoenzimas, por ejemplo) y marcadores ADN. El término de marcador molecular se empezó a generalizar cuando las técnicas permitieron estudiar fácilmente los polimorfismos a nivel de ADN y como distinción de los polimorfismos a nivel isoenzimático (Pérez, 2008).

En la actualidad, los microsatélites son los más utilizados. Estos son segmentos repetitivos de ADN que

comprenden de dos a cinco nucleótidos (repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos o pentanucleótidos) dispersos por todo el genoma en las regiones no codificadoras que hay entre o dentro de los genes (intrones) (Cortéz *et al.*, 2021; Hernández-Díaz y Jiménez García, 2011). Son utilizados frecuentemente como marcadores para el análisis de ligamiento debido a la alta variabilidad natural existente en el número de repeticiones entre los individuos. Estas regiones son propiamente inestables y susceptibles a mutaciones (Instituto Roche, 2024).

El proceso para su análisis implica extraer el ADN de las semillas y amplificar las regiones microsatélites específicas utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**). Luego, se realiza una electroforesis en gel para separar los fragmentos amplificados según su tamaño. La comparación de los perfiles obtenidos con los de las variedades o especies conocidas permite determinar si hay contaminación genética en las semillas (Blas, 2010).

Los estudios moleculares han sido de gran utilidad en el establecimiento de similitud y diferencias genéticas en especies vegetales, especialmente en aquellas donde la base de datos del ADN es conocida (Pérez, 2008; Parra, 1994). En ese sentido, los centros de investigación y mejoramiento genético, las empresas multiplicadoras de semillas y los entes que regulan el proceso de certificación de semillas, han avanzado en la adopción de esta tecnología para garantizar la calidad genética de sus cultivares.

Considerando que la identidad varietal en el proceso de certificación de semillas es de gran importancia y debido a que en el país existen antecedentes en el uso de marcadores moleculares en la determinación de la pureza varietal en cultivos como el arroz y el algodón, se plantea como objetivo compilar trabajos relacionados con el uso de marcadores moleculares para la evaluación de la pureza de semilla en Venezuela, que



sirvan de referencia en el establecimiento de un protocolo para el caso específico de lotes de semilla del cultivo de cañote.

Marcador genético

Según Villegas Castagnasso *et al.* (2021), la palabra marcar hace referencia a distinguir o diferenciar y en el contexto de una población, las diferencias permitirán distinguir entre los individuos que la conforman y también distinguirla de otras poblaciones, según el marcador utilizado, el nivel de información que ofrece y el objetivo planteado en el análisis. Estos mismos autores mencionan que “los primeros estudios de las diferencias entre individuos, se basaban en la descripción de características morfológicas” (p. 90). En el caso de las plantas, “los estudios iniciales estaban basados también en observaciones de su fenotipo como por ejemplo la altura, color de la semilla, forma de la hoja, textura de la vaina, morfología floral, etc.” (p. 91).

Es así como los marcadores genéticos son definidos por Bered *et al.* (1997) como “caracteres con un mecanismo de herencia simple que pueden utilizarse para evaluar las diferencias genéticas entre dos o más individuos” (p. 514). Para Cazaroto Grobério *et al.* (2024) “los marcadores genéticos se definen como características capaces de distinguir, predecir y caracterizan a un individuo, y que se transmiten a sus descendientes” (p. 4).

Tipos de marcadores genéticos

Marcadores morfológicos

Conocidos como descriptores morfológicos, consisten en características fenotípicas fácilmente visibles, que se puedan detectar expeditamente. Su evaluación se concentra en los rasgos morfológicos, agronómicos y fisiológicos, es decir, en aquellas características que definen la forma, apariencia, componentes del rendi-

miento y funciones fisiológicas de un conjunto de individuos. Estas características son de polimorfismo bajo, con poco nivel informativo, de expresión dominante o recesivo y su evaluación requiere el estudio de todas las fases fisiológicas de la planta, hasta el estado adulto. Su expresión puede estar influenciada por la acción de dominancia genética, por pleiotropía y epítasis, además de factores ambientales (De Vicente y Fulton, 2004).

Marcadores proteicos o bioquímicos

Según Konzen (2024), hasta la década de 1960 no se contaba con secuencias de proteínas y ADN disponible. También comenta que:

“...a medida que se mejoraron los conocimientos y las técnicas para aislar y separar proteínas y ADN, esto se aplicó precisamente a las moléculas. El gran impulso inicial para esto no fue exactamente el ADN. Era un producto suyo: las enzimas. (p. 54)

De Vicente y Fulton (2004) señalan que, los marcadores proteicos o bioquímicos se basan en las propiedades de migración de las proteínas e isoenzimas, las cuales permiten separarlas mediante electroforesis, y se pueden detectar mediante ensayos histoquímicos específicos. Las isoenzimas son definidas como diferentes formas moleculares de una misma enzima, como resultado de la presencia de secuencias diferentes del mismo gen en una población, es decir, la presencia de alelos diferentes (Konzen, 2024).

Entre las ventajas de las isoenzimas, Pérez de la Vega (1997) menciona las siguientes:

- 1) Normalmente la expresión alélica es codominante, libre de efectos epistáticos o del medio ambiente.
- 2) La especificidad enzimática permite atribuir los alelos a loci concretos, y comparar loci entre poblaciones y especies distintas.
- 3) Las diferencias alélicas se detectan como diferencias en movilidad, independientemente del papel funcional o del grado de variación de



la enzima de que se trate. 4) Los loci que se estudian están determinados por su expresión en el tejido elegido, por su posible extracción y por la disponibilidad de tinción, más que por si el gen es o no variable. 5) Se pueden estudiar simultáneamente varios marcadores, que pueden acumularse en un individuo sin causarle un efecto deletéreo. (p. 248-249)

No obstante, Martínez *et al.* (2010) mencionan que:

Su aplicación en la construcción de mapas se ha visto limitada por el número de marcadores isoenzimáticos disponibles (en general menor a 50), y por su reducido polimorfismo (2-4 alelos). Por otro lado, las formas enzimáticas extraídas de hoja o raíz (no así las de semilla) presentan variaciones en relación a las condiciones ambientales de crecimiento y a la edad del tejido, lo cual afecta la reproducibilidad de los zimogramas. (p. 71-72)

Marcadores moleculares

Son secuencias o segmentos de ADN hereditarias e identificables que se encuentran en ubicaciones específicas dentro del genoma y están ligados físicamente a loci que determinan características de interés. Se pueden usar para detectar polimorfismos de ADN y tienen un valor considerable para los recursos fitogenéticos en la definición de estrategias de conservación, estudios de análisis de brechas y desarrollo de estrategias de muestreo para bancos de germoplasma con el fin de priorizar poblaciones para la conservación (Pérez Almeida y Angulo Graterol, 2021).

Según Martínez *et al.* (2010):

Con el advenimiento de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. En la actualidad, se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo que permiten analizar la totalidad de la información genética (genoma) de un organismo. (p. 73)

Es importante destacar que de acuerdo a la metodología empleada para su detección, existen distintos tipos de marcadores, a saber: a) Marcadores basados en la hibridación del ADN, b) Marcadores basados en la amplificación arbitraria o semi arbitraria del ADN, c) Marcadores moleculares basados en la amplificación sitio-específica del ADN y d) Marcadores funcionales o de expresión (Martínez *et al.*, 2010).

Ahora bien, entre las aplicaciones de los marcadores moleculares se pueden mencionar: a) Caracterización de bancos de germoplasma para estudios de diversidad genética, estudiar el proceso de domesticación y establecer relaciones filogenéticas, b) Mapas genéticos para mostrar la distribución lineal de marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo, c) Selección asistida por marcadores para escoger individuos con características agronómicas ventajosas, d) Mapas comparativos, e) Clonado posicional que consiste en el aislamiento de un gen responsable de un carácter particular a partir del conocimiento de su localización en el genoma, f) Distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales y conservación, g) Estimación del flujo génico y h) Filogenia para reconstruir las relaciones jerárquicas de descendencia entre especies o grupos de especies (Carrera *et al.* 2010).

Carrera *et al.* (2010) destacan que los marcadores moleculares pueden utilizarse también en “el control de la pureza varietal y la discriminación de variedades protegidas que requieren de una adecuada identificación” (p. 311). Asimismo, hacen énfasis en que:

La pureza varietal es uno de los principales requisitos de la semilla comercial, ya que en la producción de semilla híbrida la heterogeneidad intralote puede originarse por falta de uniformidad en las líneas parentales, polinización cruzada espontánea o mezcla de semillas durante la siembra, cosecha o embolsado. Los individuos fuera de tipo pueden identificarse mediante el patrón molecular. Del mismo modo, pueden establecerse las relaciones de descen-



endencia entre una serie de líneas parentales y sus híbridos. (p. 311)

Considerando lo anterior, es importante resaltar que son muy pocos los trabajos realizados en donde se utilicen los marcadores moleculares como herramienta para evaluar la pureza genética de semilla proveniente de cultivares comerciales de caraota. No obstante, en Venezuela se han realizado algunos trabajos con los que ha sido posible avanzar en esta materia en otros cultivos de importancia que pueden ser tomados como referencia, ya que la mayoría de las publicaciones están orientadas al mejoramiento genético, haciendo énfasis en estudios de diversidad genética, identificación de genes de resistencia a patógenos y a condiciones ambientales adversas.

Trabajos relacionados con la evaluación de pureza genética de semilla con el uso de marcadores moleculares realizados en Venezuela

Durante los últimos años la biotecnología ha avanzado a grandes pasos, poniendo a disposición diferentes herramientas para la investigación científica, las cuales han evolucionado a la luz de nuevos descubrimientos, haciéndolas cada vez más eficientes y específicas. En el caso de la evaluación de la pureza genética de semillas en Venezuela, se han realizado varios trabajos con diferentes herramientas que han permitido evaluar la calidad en diversos lotes de semillas de varios cultivos. Los primeros trabajos utilizaron marcadores proteicos o bioquímicos (isoenzimas) que eran los disponibles en ese momento; posteriormente, se citan trabajos realizados con marcadores moleculares tipo microsatélites, herramienta de más reciente desarrollo.

A pesar de la versatilidad en cuanto a su uso con diferentes propósitos, este artículo se limita a la revisión de los trabajos realizados en Venezuela, en los que se han utilizado marcadores genéticos para evaluar la

pureza de lotes de semilla con la finalidad de establecer un protocolo específico para el caso de la caraota, cultivo de interés nacional, cuyo proceso de escalamiento dentro del sistema formal de multiplicación de semilla ha sido poco cuidadoso y sin garantía de su pureza genética, lo que dificulta el cumplimiento de la normativa legal vigente por parte de las empresas semilleras.

El primer trabajo analizado fue realizado por Rodríguez *et al.* (2005), quienes utilizaron patrones isoenzimáticos para caracterizar la semilla de cuatro cultivares comerciales de arroz (Cimarrón, Araure 4, FONAIAP 1 y Palmar) en sus categorías genética, fundación, registrada y certificada, provenientes de los sistemas formal e informal de producción de semilla. Basado en estudios de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón, evaluaron las enzimas fosfogluconato deshidrogenasa (**PGD**), beta esterasa (**β -Este**), sinquimato deshidrogenasa (**SDH**), alfa esterasa (**α -Este**), fosfoglucoasa isomerasa (**PGI**) isocitrato deshidrogenasa (**IDH**) y malato deshidrogenasa (**MDH**).

Para la evaluación de los patrones isoenzimáticos de las variedades y categorías de semilla, establecieron siete combinaciones, utilizando plúmulas de los cultivares FONAIAP 1 y Araure 4 como plantas puras y plúmulas de Cimarrón y Palmar como plantillas contaminantes en las siguientes proporciones: 100 (99:1), 50 (49:1), 25 (24:1), 20 (19:1), 15 (14:1), 10 (9:1) y 5 (4:1).

De las siete isoenzimas utilizadas, sólo tres (PGI, IDH y MDH) mostraron uniformidad total en el patrón de cada cultivar y se logró diferenciar los cultivares Araure 4, Cimarrón, FONAIAP 1 y Palmar, coincidiendo con los resultados obtenidos por Ortíz *et al.* (2002) sobre el uso de isoenzimas para la determinación de la pureza genética de esos cultivares.

La PGI mostró dos bandas a 2 y 3,5 cm del punto de



origen en los cultivares Araure 4 y Palmar, respectivamente; mientras que Cimarrón y FONAIAP 1 presentaron bandas a 1,8 y 3,0 cm. Los patrones obtenidos con la isoenzima IDH, mostraron que Araure 4, FONAIAP 1 y Palmar, presentan una banda a 2,0 y 2,5 cm, mientras que Cimarrón posee bandas a 2,5 y 3,0 cm. Finalmente, la MDH mostró que el cultivar Palmar presentó una banda a 1,7 cm, lo que permitió diferenciarla del resto de los cultivares, que la presentaron a 1,0 cm.

El tamaño óptimo de la muestra para determinar el porcentaje de contaminación fue de 50 plantas, compuesta por 49 plantas del cultivar evaluado y una del contaminante (49:1), en la que se obtuvo la mejor resolución de bandas de isoenzimas y alta capacidad visual de la presencia del contaminante. El patrón isoenzimático de la semilla genética de las variedades Cimarrón y Palmar resultó idéntico al patrón del resto de las categorías de semilla de cada uno, mientras que en el resto de las variedades evaluadas, el patrón de la semilla genética fue diferente al de las otras categorías, lo que demuestra que dichos lotes estaban contaminados.

Para determinar el porcentaje de contaminación en la semilla categoría registrada de Araure 4 y la semilla del sistema informal de FONAIAP 1, se realizó una corrida electroforética con ADN de 50 plántulas de cada variedad y, como testigos, las variedades Cimarrón y Palmar, ambas de categoría genética. Para el caso de Araure 4, se encontraron 13 contaminantes, lo cual representó un 26% de contaminación con un intervalo de confianza entre 15,5 y 40%; mientras que FONAIAP 1, presentó tres contaminantes que representó un 8% de contaminación con un intervalo de confianza entre 0,45 y 15,5%.

Los autores de este trabajo, destacan la particularidad de que los contaminantes de Araure 4 y FONAIAP 1 presentan patrones isoenzimáticos diferentes al de los testigos (Cimarrón y Palmar) lo que hace presumir que corresponden a arroz rojo o cualquier otra variedad

con la que haya ocurrido una mezcla física o genética en alguna fase del proceso de certificación.

La consistencia de los patrones isoenzimáticos de los cultivares evaluados y sus distintas categorías permitieron demostrar la pureza genética de los lotes de semilla. En algunos casos, la desviación del patrón isoenzimático de un lote con respecto al de la semilla genética original, está asociada a contaminación debido al manejo inadecuado de la semilla durante las diversas fases del proceso de multiplicación o procesamiento.

En este mismo orden de ideas, Ramis Jaumes (2007) estableció la metodología práctica a seguir para la certificación de la pureza varietal en arroz, la cual se utilizó en 60 muestras representativas de los campos de producción de semilla de las variedades Araure 1, Araure 4, Cimarrón, FONAIAP 1, FONAIAP 2000, Palmar, Fundarroz PN1 y Zeta15 del año 2000. Para tal fin, utilizó los sistemas enzimáticos IDH, PGI y MDH en geles de almidón siguiendo la metodología de Rodríguez *et al.* (2005) con plántulas de 15 días de germinación. Es importante destacar, que en este trabajo se incorporó otra metodología de electroforesis; usando geles de acrilamida para la enzima α -EST, según el protocolo de Velásquez (2001). Se verificaron los patrones isoenzimáticos ya conocidos de los cultivares Cimarrón, FONAIAP1, Araure1, Araure4, Zeta 15 y Palmar (Rodríguez *et al.* 2005); pero desconocidos para FONAIAP 2000 Y PN-1.

Los patrones isoenzimáticos obtenidos permitió verificar la estabilidad y confiabilidad de este tipo de análisis, ya que fueron los mismos que para trabajos anteriores. En el caso de la enzima α -EST, se obtuvieron patrones diferentes que permitieron distinguir la variedad Cimarrón de FONAIAP 1 debido a que la electroforesis fue realizada en geles de acrilamida. En este trabajo se resalta el hecho de que con las enzimas incluidas no se pudo distinguir Cimarrón de Araure 1,



pues ellas son distintas para la isoenzima SDH; ni tampoco FONAIAP-1 de PN-1.

Con las enzimas incluidas no se pudo distinguir Cimarón de Araure 1, pues ellas son distintas para la isoenzima SDH; ni tampoco FONAIAP-1 de PN-1. Los resultados obtenidos por Ramis Jaumes (2007) evidencian que a medida que se incrementa el número de cultivares es necesario aumentar el número de marcadores moleculares para lograr su distinguibilidad.

Igualmente, se procedió a verificar la posible contaminación de cada uno de los lotes siguiendo el procedimiento de Rodríguez *et al.* (2005). La metodología correspondiente a la primera fase permitió identificar 27 de los 60 lotes analizados “posiblemente contaminados”. De esos lotes se seleccionaron cinco para ser analizados planta por planta. Los resultados de esta segunda etapa mostraron que para tres lotes no se apreciaron contaminantes, mientras que para dos lotes se observó entre un 5 y 22% de contaminación. Estos resultados apoyaron la idea de la necesidad de realizar el análisis planta a planta una vez detectada la posible contaminación de un lote cuando se trabaja con electroforesis de isoenzimas.

Es así, como se detectó la deficiencia en la calidad de la semilla, especialmente en lo referente a su pureza varietal. A partir de una serie de trabajos surgió la inquietud por parte de la Comisión Nacional de Semillas (anteriormente SENASEM), ente rector de la materia en Venezuela, el hecho de impulsar la inclusión de este tipo de análisis en el proceso de multiplicación y certificación de semillas de arroz.

Como es conocido, la presencia de semillas de malezas comunes o nocivas es un aspecto delicado en la determinación de la pureza de un lote de semilla. En el caso del arroz, se ha mencionado la existencia de arroz rojo en plantaciones de arroz para semilla, lo cual no está permitido en la semilla cosechada de las

categorías genética y de fundación, según las normas vigentes en Venezuela. No obstante, se permite una planta de arroz rojo por hectárea y hasta 3 semillas por kilogramo de arroz. Es aquí en donde el trabajo realizado por Ortíz *et al.* (2002) cobra importancia debido a la evaluación que realizaron, mediante la técnica de caracterización con isoenzimas, de cultivares comerciales de arroz y cinco ecotipos de arroz rojo colectados en campos de producción de los estados Cojedes, Portuguesa, Barinas y Guárico.

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos para cada patrón isoenzimático (número de bandas), donde se aprecia el alto polimorfismo presente en la enzima PGI en los ecotipos de arroz rojo, que ayudó a diferenciarlos de los cultivares comerciales. El ecotipo Cojedes presentó un patrón isoenzimático similar a algunos cultivares; sin embargo, el mismo ecotipo logró separarse con un patrón único para PGD. Los resultados obtenidos mostraron la bondad del análisis isoenzimático y, en vista de la variabilidad presente en la maleza, la necesidad de ampliar el estudio en cuanto a un mayor número de ecotipos y marcadores.

Con la finalidad de corroborar que el arroz rojo logra polinizar y fertilizar al arroz cultivado, se estableció en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela – Núcleo Maracay (**FAGRO-UCV**), una parcela experimental donde se introdujo de 1 a 50 plantas de arroz rojo.m-2 en una siembra del cultivar ZETA15, constituyendo 11 tratamientos.

Al momento de la floración se observó la presencia de plantas fuera de tipo que se clasificaron como arroz rojo e ‘híbridos’. De estos últimos se cosechó sus semillas y se sembraron a fin de caracterizar morfológicamente las plantas resultantes, logrando identificar aquellas de características intermedias entre el cultivar comercial y el arroz rojo que corresponderían a una generación F1. La semilla de la siguiente genera-



Cuadro 1

Huellas moleculares (número de bandas detectadas) de los cultivares de arroz Cimarrón, Araure4, Araure1, ZETA15 y cinco ecotipos de arroz rojo mediante el uso de isoenzimas.

Cultivar	Patrón electroforético por sistema isoenzimático				
	EST	PGD	IDH	PGI	SDH
Cimarrón	1	1	1	1	1
Araure 4	1	1	2	1	1
Araure 1	2	1	2	2	1
Zeta 15	1	1	1	1	2
Barinas	1	1	1	3	1
Portuguesa 1	1	1	1	4	1
Portuguesa 2	1	1	1	5	1
Cojedes	1	2	1	1	2
Calabozo	1	1	1	6	1

Nota. Adaptado de “Huellas moleculares de los cultivares de arroz Cimarrón, FONAIAP1, Araure4, Araure1, ZETA15, Palmar, FONAIAP 2000, PN-1 y cinco ecotipos de arroz rojo a través de las isoenzimas α -esterasa (EST), fosfoglucoosa deshidrogenasa (PGD), isocitrato deshidrogenasa (IDH), fosfoglucoisomerasa (PGI) y siquimato deshidrogenasa (SDH)” por C. Ramis Jaumes, 2007.

ción (F2) cosechada de las plantas en umbráculo, se utilizaron para el análisis molecular junto con la semilla genética de ZETA15, el arroz rojo utilizado en la primera siembra y las semillas remanentes del ‘híbrido’ (F1).

El análisis se realizó planta por planta usando las enzimas ACP y β -EST a un total de 20 plantas de la generación F2. Ramis (2007) logró identificar dos loci β -ETS1 y β -EST2 para la enzima β -EST, por lo que propuso la hipótesis de que los patrones presentes correspondían a la segregación esperada de la comigración de dos isoenzimas monoméricas independientes. Con esta hipótesis se plantearon los patrones electroforéticos y se le asignaron los genotipos correspondientes a cada planta, y su comprobación se hizo mediante una prueba de bondad de ajuste, cuyos resultados permitieron afirmar que las plantas estudiadas correspondían a una F2 del cruce entre la variedad cultivada Zeta 15 y el arroz rojo.

Por su parte, Pérez-Almeida *et al.* (2011) estudiaron la diversidad genética entre las variedades comerciales de arroz en Venezuela, analizando la genealogía de 19 cultivares liberados durante los años 1978 y 2006; los cuales ocuparon importantes áreas cultivadas en el país y se conocía su pedigrí.

Con esta información, calcularon el coeficiente de parentesco (r_{xy}) para todos los pares de combinaciones posibles de los 19 genotipos, aplicando los supuestos de St. Martin (1982); los cuales son: a) los ancestros y cultivares son homocigotos y homogéneos, b) genotipos sin ancestrales comunes no están relacionados y el coeficiente de consanguinidad es cero ($F=0$), y c) los progenitores contribuyen igualmente a la progenie, ésta es una medida de la ascendencia común entre dos genotipos y de la diversidad genómica latente (ICIS, 2011). Los autores construyeron el dendrograma con el coeficiente de parentesco como medida de similitud y los materiales fueron agrupados median-



te el uso del método de fusión de los promedios no ponderados (UPMGA).

A partir de semilla genética o de fundación, tomaron muestras de tejidos de hojas jóvenes de plántulas con 15 días de edad de los 19 materiales de arroz para garantizar su pureza genética y el ADN se extrajo utilizando la metodología de Zambrano *et al.* (2002). La calidad y cantidad de este fue verificada en geles de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio, y se comparó con estándares comerciales de concentración conocida. Los autores evaluaron 44 microsatélites ubicados en todo el genoma del arroz y se visualizaron en gel de poliacrilamida al 6% revelado con nitrato de plata. Finalmente, se estimó el peso molecular de los alelos para cada marcador.

El estudio de diversidad genética se realizó con un análisis de correspondencia múltiple que equivale al análisis de componentes principales en variables categóricas, siendo una técnica descriptiva de análisis multivariado que busca identificar estructuras en la población bajo estudio en términos de variables e individuos representados en un espacio tridimensional. Esto ayudó determinar la presencia de grupos entre los genotipos estudiados e inferir la relación entre los mismos.

Estos autores encontraron un coeficiente de parentesco (r_{xy}) entre las variedades comerciales estuvo entre 0,07 y 0,99, con varios cultivares altamente relacionados ($r_{xy} \geq 0,50$) entre sí. Tres de las variedades están poco relacionadas con las sembradas en Venezuela como un todo, siendo éstas Araure 1, FONAIAP 1 y Cimarrón, las cuales tenían un r_{xy} promedio con el grupo de 0,13; 0,15 y 0,15, respectivamente. Por otra parte, existen otros materiales que comparten gran parte de sus genes (>50%), entre los que están D-Sativa y Z-15 ($r_{xy} = 0,99$) por ser dos cultivares seleccionados del mismo cruce; Venezuela 21 con D-Sativa ($r_{xy} = 0,53$); Venezuela 21 con Z-15 ($r_{xy} = 0,53$) pues el cruce que

originó a las variedades (DSativa o Zeta 15) fue progenitor de Venezuela 21; y Fedearroz 50 con Centauro ($r_{xy} = 0,57$) dado que Fedearroz 50 es progenitor de Centauro. Existen otras relaciones intermedias del coeficiente de parentesco promedio de 0,30 r_{xy} .

Algunos de los iniciadores utilizados en este estudio presentaron alelos únicos que permitieron la identificación de cultivares, lo cual denota la utilidad de los microsatélites. Por ejemplo, los alelos 2, 3 y 4 del iniciador RM21 diferenciaron las variedades Fedearroz 2000, Cimarrón y FONAIAP 2, respectivamente. Los alelos 2 y 3 del iniciador RM279 son únicos para FONAIAP 1 y D-Oryza. Igualmente, dos de los iniciadores evaluados presentan alelos únicos para distinguir la variedad FONAIAP 2000 (alelo 2 del RM169 y alelo 1 del RM222); el alelo 1 del RM174, para Centauro; alelo 2 del RM224 para Fundarroz PN-1; el alelo 1 del RM228 para FONAIAP 1; el alelo 2 del RM231 para D-Primera y el alelo 1 del RM551 para Araure 3. El Análisis de Correspondencia Múltiple indicó que un 58,75% de la inercia total es explicada por tres componentes; mientras que en el análisis de agrupamiento se encontraron seis grupos utilizando estas dimensiones.

En otro trabajo realizado por De Faría (2015) con el objetivo de determinar la pureza varietal de semilla categoría genética de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) a través de marcadores moleculares tipo microsatélites, se evaluaron los cultivares Delta Pine, Alcalá 90, Alma 6 y Cabuyare a partir de semillas colectadas en campos aislados de producción del estado Apure y semilla proveniente de generaciones de autofecundación dirigida en los ciclos secos 2012-2013 y 2013-2014, en el Campo Experimental del Instituto de Genética de la FAGRO-UCV.

La investigación se realizó en tres fases: Estudio de polimorfismo, determinación del tamaño de muestra y verificación de pureza varietal. Para el estudio de polimorfismo, se sembraron semillas colectadas y se



utilizaron cinco plántulas de cada cultivar con tres repeticiones; extrayendo el ADN utilizando el protocolo de Muhammad *et al.* (2008). La calidad y cantidad de ADN extraído por muestra se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en presencia de bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g}$ de EtBr. mL^{-1}) y la amplificación de microsatélites se realizó por la técnica de PCR Microsatélites, utilizando 22 de estos distribuidos a través del genoma del algodón.

De los 22 microsatélites incluidos en el estudio, sólo se observó polimorfismo para ocho de ellos con un total de 46 alelos y un promedio de 2,3 alelos/locus. Se observó bajo polimorfismo (40%), lo que refleja la proximidad genética de los cuatro cultivares. Sin embargo, se observó distinguibilidad y buena resolución para los microsatélites CIR307, JESPR65, BNL1227, BNL1421, BNL1495, BNL1694, JERSPR292 y BNL1707 para las cuatro variedades analizadas. No se detectaron perfiles electroforéticos con alelos únicos, por lo que para poder distinguir las variedades, se debe recurrir a la combinación de los alelos de por lo menos dos microsatélites.

Siguiendo la estrategia utilizada por Rodríguez (2005), establecieron combinaciones para verificar la presencia de al menos una planta como contaminante en la muestra global de plantas utilizadas. Se establecieron combinaciones comenzando con cinco plantas (cuatro de una variedad + una de otra variedad que actuaría como contaminante) hasta la combinación de 110 plantas con una contaminante (109+1). Se escogió a Delta Pine 16 como la variedad pura y se establecieron dos combinaciones contaminantes, es decir, una serie de 12 muestras diferentes con Delta Pine 16 + Alma 6 y otras 12 diferentes muestras con Delta pine16 + Cabuyare.

La técnica de PCR presentó mayor sensibilidad, ya que permitió evidenciar la presencia de un contaminante hasta en un tamaño de muestra conformado por

100 plantas, lo que coincide con lo reportado por Perdomo Leiva (2006), quien realizando una comparación de las técnicas de isoenzimas y microsatélites para la identificación de 50 genotipos de arroz, observó una mayor ventaja de la técnica de microsatélites con respecto a las isoenzimas, tanto por el polimorfismo observado, como también en la mejor visualización y reproducibilidad de los microsatélites. Igualmente, observó isoenzimas con patrones de bandas distintos para un mismo genotipo, dependiendo de la edad de la muestra (días después de siembra) y el tipo de sistema electroforético. Por tanto, este trabajo evidencia la confiabilidad de los microsatélites para la distinguibilidad de cultivares y la determinación de la pureza varietal de lotes de semillas.

Para la fase de verificación de la pureza varietal, se procedió a seleccionar los microsatélites que presentaron una buena resolución en geles de acrilamida o agarosa y permitieron una clara diferenciación entre cultivares de manera de evidenciar cualquier posible contaminación entre ellos. Se demostró la correspondencia entre los genotipos esperados para cada cultivar y el microsatélite; así como las tres repeticiones de semilla clase genética utilizadas. Con estos resultados se comprueba la pureza varietal de los lotes de semilla evaluados y de la eficiencia del método de tapado de las flores para la producción de semilla de identidad genética verificada.

Consideraciones Finales

Con base a los resultados de los trabajos revisados en este artículo, se evidencia la alta factibilidad y fiabilidad del uso de marcadores genéticos para determinar la pureza de lotes de semilla y, en el caso de caraota, se procederá a establecer el protocolo específico para evaluar lotes de semilla de este importante rubro.

Por analogía, se establecerá la metodología respectiva que permita evaluar la pureza de lotes de semilla



de caraota, utilizando marcadores moleculares; con la finalidad de contar con herramientas sólidas que garanticen la calidad genética de los lotes con fines de multiplicación.

Es de resaltar que para el actual órgano rector de la materia de semilla en Venezuela, la Comisión Nacional de Semilla (**CONASEM**), estas técnicas son de gran importancia y utilidad en situaciones que ameriten la identificación de un material en particular, debido a que ofrecen un alto nivel de confiabilidad y no son afectadas por el ambiente, además de que constituyen una valiosa herramienta para todos los actores del proceso semillero a fin de evaluar y garantizar la identidad genética de sus materiales de propagación.

Literatura Citada

- Bered, F., Fernandes Barbosa Neto, J., Félix de Carvalho, F. I. (1997). Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciencia Rural*, 27(3), 513-520. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781997000300026>
- Blas, R. (2010). *Marcadores Moleculares*. [Diapositiva Power Point] Recuperado de <https://es.slideshare.net/slideshow/marcadores-moleculares/8715195>
- Carrera, A., Tranquilli, G., Garayalde, A., Helguera, M. (2010). Aplicaciones de los marcadores moleculares. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (pp. 70-85). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Cazaroto Grobério, R. B., Dos Santos Bonelá, E., Smassaro Morais, G., Tognere, J., Paiva Carrara, M., Garbrecht Feltz, D., Schimdt, E. R., Lima Gontijo, A. B. P. (2024). Marcadores moleculares no melhoramento genético do mamoeiro: Uma revisão da literatura. *Revista Delos*, 17(59), e2023. <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n59-041>
- De Faría, Y. (2015). *Determinación de la pureza varietal de semilla clase Genética de cuatro cultivares de algodón (Gossypium hirsutum L.) con el uso de marcadores Moleculares tipo microsátélites (SSR)*. [Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela].
- De Vicente, M. C., y Fulton, T. (2003). *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). http://cgkb.cgiar.croptrust.org/images/file/learning_space/molecular_markers/volume1/Copyright.pdf
- Flores, Z.; Aponte, L. y López, N. (2016). Aspectos legales y estadísticas del sistema de producción y certificación de semilla de caraota. *INIA Divulga*, 35 (35), 52-57. <http://www.publicaciones.inia.gob.ve/index.php/iniadivulga/article/view/747>
- Hernández-Díaz, Y. y Jiménez García, M. (2011). Los marcadores moleculares: herramientas innovadoras en biología molecular. *Kuzulkab' Revista de Divulgación*, 17(32), 37-41. <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/download/374/297/1295>
- HEROGRAMA Especiales. (13 de diciembre de 2022). La importancia de la biotecnología en la agricultura. <https://herogramaspeciales.com/la-importancia-de-la-biotecnologia-en-la-agricultura/>
- International Convention for the Protection of New Varieties of Plants. (1961). Convention: Constitution of a Union. UPOV Publication no: 293.



<https://www.upov.int/portal/index.html.es>

Instituto Roche. (2024). Microsatélite. En Glosario de Genética. Recuperado de <https://www.instituto-roche.es/recursos/glosario/Microsatelite>

International Seed Testing Association. (2024). *International Rules for Seed Testing* [Archivo PDF]. <https://www.seedtest.org/api/rm/6H27E9C83E-7HR2K/ista-rules-2024-00-introduction-final-2.pdf>

Kozen, E. R. (2024). Genética no cotidiano: Material de apoyo para o curso. <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/282733/001205521.pdf?sequence=1>

Ley de Semillas. (2015). Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 6.207 (Extraordinario). Diciembre, 28, 2015. <https://www.asambleanacional.gob.ve/storage/documentos/leyes/ley-de-semillas-20211025164906.pdf>

Márquez, M. (2003). Manual de laboratorio para el análisis y la certificación de semillas. *CENIAP Hoy*, 2.

Martínez, M. C., Helguera, M., Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (pp. 70-85). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Muhammad, A., Muhammad, T., Shahid, I., Shahid, N., Shiraz, A., Amjad, A. (2008). Hybrid authentication in upland cotton through RAPD analysis. *Australian Journal of Crop Science*, 2(3), 141-149. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=461717feb5f-0665db6378dc87d336b79c21e411e>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2003-04. La Biotecnología Agrícola: ¿una respuesta a las necesidades de los pobres?* Recuperado de <https://www.fao.org/4/y5160s/y5160s00.htm#TopOfPage>

Ortiz, A., Ramis, C., Parra, P., Díaz, A., López, L. (2002). Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela. *Revista Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela*, 28, 117-130.

Onamu, R., Legaria Solano, J., Sahagún Castallenos, J., Rodríguez, J. y Pérez Nieto, J. (2012). Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(4), 267-277. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.4.267>

Parra, P. (1994). *Estudio de relaciones de parentesco entre líneas de Phaseolus vulgaris L. aplicando análisis electroforético mediante el uso de algunos marcadores biosistemáticos*. [Tesis de grado Doctoral, Universidad Central de Venezuela].

Perdomo Leiva, M. C. (2006). *Comparación de dos técnicas moleculares (isoenzimas y microsatélites) para la obtención de la huella molecular en genotipos de arroz*. [Tesis de grado, Universidad Central de Venezuela]. <http://sibucv.ucv.ve/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=10346>

Pérez-Almeida, I. B., Torres, E. A., Angulo Graterol, L. R., Acevedo Barona, M. A. (2011). Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores molecu-



- lares microsatélites (SSR). *Interciencia*, 36(7), 545-551. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33919424011>
- Pérez Almeida, I. B., y Angulo Graterol, L. R. (2021). Marcadores moleculares como apoyo al fitomejoramiento. *Revista de Investigación Científica Tayacaja*, 4(2), 83-89. <https://revistas.unat.edu.pe/index.php/RevTaya/article/view/175/143>
- Pérez de la Vega, M. (1997). *Marcadores moleculares, variabilidad genética en las poblaciones y evolución*. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular, Coruña, Egipto. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2239007>
- Pérez, M. (2008). *Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución*. Memorias del III simposio científico en biología celular y molecular. Universidad de León, España. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=P%3%A9rez%2C+M.+%282008%29.+Marcadores+moleculares%2C+variabilidad+gen%3%A9tica+y+evoluci%3%B3n.+Memorias+del+III+simposio+cient%3ADfco+en+biolog%3ADa+celular+y+molecul+lar.&btnG=
- Ramis Jaumes, C. M. (2007). *Aporte del Laboratorio de Genética Molecular del CIBA al desarrollo de la biotecnología del arroz (Oryza sativa L.) en Venezuela* [Trabajo de Ascenso, Universidad Central de Venezuela]. <http://sibucv.ucv.ve/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=165099>
- Rodríguez, N.; Cerovich, M.; Ramis, C.; Miranda, F.; Trujillo, A. y Figueroa, R. (2005). Uso de patrones isoenzimáticos para determinar la pureza genética de la semilla de arroz en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 55(3), 381-396. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2005000300004&Ing=es&tIng=es
- St. Martin, S. (1982). Effective population size for soybean improvement program in maturity groups 00 to IV. *Crop Science*, 22, 151-152. https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=St.+Martin%2C+S.+%281982%29.+Effective+population+size+for+soybean+improvement+program+in+maturity+groups+00+to+IV.+Crop+Sci.+22%3A+151-152.&btnG=
- Solis Ramos, L., y Andrade Torres, A. (2005). *¿Qué son los marcadores moleculares?* <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/5634/20051P41.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Tibihika, P. D., Curto, M., Dornstauder Schrammel, E., Winter, S., Alemayehu, E., Waidbacher H., y Meimberg, H. (2019). Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. *Conservation Genetics*, 20, 357-372. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1136-x>
- Velásquez, R. (2001). *Control genético de tres sistemas isoenzimáticos en arroz (Oryza sativa L.)* [Trabajo de Ascenso, Universidad Central de Venezuela].
- Villegas Castagnasso, E. E., Posik, D. M., Crespi, J. A. (2021). Marcadores genéticos: Introducción al análisis y su aplicación en diversas áreas biológicas. En C. I. Catanesi y E. E. Villegas Castagnasso (eds.) *Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas* (pp. 90-108). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/131500>



Zambrano, A., Demey, J., Martínez, G., Fuenmayor, F., Gutiérrez, Z., Saldaña, G., Torrealba, M. (2002). Método rápido, económico y confiable de mini-preparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agronomía Tropical*, 52, 235-243. <https://biblat.unam.mx/es/revista/agronomia-tropical-maracay/articulo/metodo-rapido-economico-y-confiable-de-minipreparacion-de-adn-para-amplificaciones-por-rapd-en-bancos-de-germoplasma>

