



Caracterización molecular de 54 accesiones de guanábana (*annona muricata* L.) y 60 de mango (*mangifera indica* L.) a través de marcadores genéticos moleculares

Molecular characterization of 54 accessions of soursop (*annona muricata* L.) And 60 of mango (*mangifera indica* L.) using molecular genetic markers

**Artículo resultado de proyecto de investigación financiado por
La Universidad Estatal de Santa Elena**

Armas Moreno Mónica Isabel
Universidad Estatal de Santa Elena
<https://orcid.org/0000-0002-4467-9348>
monica.armasm@upse.edu.ec
Santa Elena Ecuador

Javier Soto Valenzuela
Universidad Estatal de Santa Elena
<https://orcid.org/0000-0002-0815-6689>
Javier.sotov@upse.edu.ec
Santa Elena- Ecuador

<http://centrosuragraria.com/index.php/revista>

Publicada por: Instituto Edwards Deming
Quito - Ecuador
Julio - Diciembre vol. 1. Num. 4 2019

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

RECIBIDO: 23 DE JUNIO 2018
ACEPTADO: 9 DE NOVIEMBRE 2018
PUBLICADO: 4 DE JULIO 2019

RESUMEN

Los frutales forman parte de la diversidad de plantas comestibles, muchas de ellas todavía silvestres y localizadas principalmente en las regiones tropicales. La investigación y el desarrollo de la agricultura en el mundo se han limitado a unas 150 especies, dejando a un lado otras con potencial económico. En el país el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) con su Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) a través del Programa de Fruticultura posee una colección con 54 accesiones de guanábana, provenientes de diferentes provincias de la costa como Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro y de la sierra ecuatoriana como Santo Domingo, Azuay y Loja e incluso algunas introducidas de Brasil, encontrándose al momento esta colección en la etapa de caracterización agromorfológica. El nivel de importancia económica que tiene este cultivo en el país conlleva a garantizar su conservación, por lo cual, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con su Estación Experimental Portoviejo, mantiene un Banco de Germoplasma con trece variedades tradicionales, de las cuales cinco son de Ecuador, tres de Israel y tres de Estados Unidos (KNUDSEN, 2000); todas ellas conservadas en campo, lo que representa la variabilidad genética existente en el país. En la actualidad la detección de polimorfismos genéticos se ha llevado a cabo mediante diversos métodos, entre ellos la utilización de marcadores moleculares, que brindan una excelente vía para obtener una gran cantidad de datos sobre los procesos de conservación que pueden dar origen a patrones de variación, proporcionando información que resulta de gran utilidad para un eficiente manejo y explotación de la variabilidad presente en las colecciones o bancos de germoplasmas.

PALABRAS CLAVE: origen, clasificación taxonómica

ABSTRACT

Fruit trees are part of the diversity of edible plants, many of them still wild and located mainly in tropical regions. The research and development of agriculture in the world have been limited to some 150 species, leaving aside others with economic potential. In the country, the National Autonomous Institute of Agricultural Research (INIAP) with its Experimental Station of the South Coast (EELS) through the Fruit Growing Program, it has a collection with 54 accessions of soursop, from different coastal provinces such as Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos and El Oro and from the Ecuadorian highlands such as Santo Domingo, Azuay and Loja and even some introduced from Brazil, this collection being at the moment in the stage of agromorphological characterization. The level of economic importance that this crop has in the country leads to guarantee its conservation, for which reason, the National Institute of Agricultural Research with its Portoviejo Experimental Station, maintains a Germplasm Bank with thirteen traditional varieties, of which five are of Ecuador, three from Israel and three from the United States (KNUDSEN, 2000); all of them conserved in the field, which represents the existing genetic variability in the country. Currently, the detection of genetic polymorphisms has been carried out by various methods, including the use of molecular markers, which provide an excellent way to obtain a large amount of data on the conservation processes that can give rise to patterns of variation. , providing information that is very useful

for an efficient management and exploitation of the variability present in the collections or genebanks.

KEY WORDS: origin, taxonomic classification

INTRODUCCIÓN

Los frutales forman parte de la diversidad de plantas comestibles, muchas de ellas todavía silvestres y localizadas principalmente en las regiones tropicales. La investigación y el desarrollo de la agricultura en el mundo se han limitado a unas 150 especies, dejando a un lado otras con potencial económico (IPGRI. 2000).

Uno de éstos grupos es la familia *Annonaceae*, autóctona del continente americano y con gran capacidad de crecer en diferentes condiciones tropicales y subtropicales (BENAVIDES A. 2001); representada en su gran mayoría por el género *Annona*, el cual es comestible y conformado por las especies *A. reticulata* (anona corazón), *A. squamosa* (anona), *A. purpurea* (sincoya), *A. muricata* (guanábana), entre otras.

Annona muricata L. comúnmente conocida como guanábana es originaria de la región tropical de Sudamérica. Actualmente se cultiva desde el sur de la Florida hasta el sur de Brasil (FAO, 2006).

CHICAIZA G. *et al*, (2003) expresan que es una fruta conocida en el mercado ecuatoriano, pero no se registra información detallada sobre la misma de acuerdo al III Censo Nacional Agropecuario, ya que se presenta una reducida información estadística censal, puesto que la producción de guanábana es esporádica, y adicionalmente porque es un producto nuevo que forma parte del grupo de los productos no tradicionales.

MOREIRA R. (2011, com. pers) acota que el Ecuador en los últimos años ha incrementado la superficie de este cultivo debido a la demanda de mercados internacionales, principalmente el colombiano, el mercado local y el de Estados Unidos; el primero absorbía sobre el 90 % de la producción de este frutal, pero en los últimos años las exportaciones han tenido un repunte hacia el mercado norteamericano. Actualmente, el mercado local constituye un eslabón importante en el consumo de guanábana, debido al cambio de cultura en el consumo de frutas.

En el país el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) con su Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) a través del Programa de Fruticultura posee una colección con 54 accesiones de guanábana, provenientes de diferentes provincias de la costa como Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro y de la sierra ecuatoriana como Santo Domingo, Azuay y Loja e incluso algunas introducidas de Brasil, encontrándose al momento esta colección en la etapa de caracterización agromorfológica.

Así mismo, tenemos al mango (*Mangifera indica* L.), el cual es indudablemente la especie de mayor importancia de las familias de las Anacardiáceas, tanto por su distribución mundial como por su importancia económica (GALÁN V. 2009).

De acuerdo con las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde los años sesenta cuentan niveles de producción significativos en países como Brasil, Venezuela, Perú, Ecuador, Paraguay y Colombia.

ARIAS M. *et al.*, (2004) señalan que en el Ecuador existen alrededor de 9 500 ha. de mango distribuidas en 180 productores, de las cuales 6 000 a 7 000 están en producción, concentradas en un 95 % en la provincia del Guayas y el 5 % en Los Ríos, El Oro y Manabí.

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR (2010, en línea) indica que nuestro país es un importante proveedor de mango entre los meses de Octubre y Febrero con las siguientes variedades exportables: Tommy Atkins 65 %, Haden, Kent y Keitt 35 %. Los principales exportadores en el 2008, según su participación en las ventas mundiales, fueron: India 18.9 %, Perú 11.3 % y Brasil 10.5 %.

El nivel de importancia económica que tiene este cultivo en el país conlleva a garantizar su conservación, por lo cual, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con su Estación Experimental Portoviejo, mantiene un Banco de Germoplasma con trece variedades tradicionales, de las cuales cinco son de Ecuador, tres de Israel y tres de Estados Unidos (KNUDSEN, 2000); todas ellas conservadas en campo, lo que representa la variabilidad genética existente en el país.

Entre la conservación de recursos genéticos la técnica de caracterización molecular es una valiosa herramienta para la selección de especies que presenten características genotípicas de interés, por su independencia del medio ambiente y el alto nivel de polimorfismo que se puede encontrar distribuido por todo el genoma (RALLO *et al.*, 2005, citado por FENDRI M. 2008).

Los marcadores morfológicos y/o agronómicos siguen siendo utilizados ampliamente ya que no requieren medios o tecnologías complicadas y también son los únicos marcadores basados en la observación directa de la planta.

No obstante, el empleo de descriptores fenotípicos, presenta dificultad en la evaluación de muchos de los caracteres como por ejemplo los relativos a las inflorescencias.

En consecuencia, se demanda de personal con experiencia que sea capaz, sobre todo, de diferenciar entre variabilidad debida a la genética y aquella debida a la fluctuación ambiental. Dicha experiencia requiere tiempo, y la identificación con este tipo de marcadores ha llevado en algunos casos a caracterizaciones erróneas.

Asumiendo la importancia agronómica de las dos especies a evaluar y teniendo en cuenta la variación que presenta la caracterización fenotípica, la presente investigación busca caracterizar a nivel molecular las colecciones del Banco de Germoplasma de guanábana y mango *ex-situ* de las Estaciones Experimentales del INIAP del Litoral Sur y Portoviejo, mediante el uso de marcadores moleculares RAPD'S y Microsatélites (SSR's) respectivamente. La caracterización a través de marcadores moleculares, es una valiosa herramienta que tiene varias ventajas, como su independencia del medio ambiente y el alto nivel de polimorfismo que se puede encontrar distribuido por el genoma. El procedimiento es además fiable, rápido y económicamente rentable.

Considerando la relevancia de estos marcadores, se puede determinar que son los idóneos para obtener información de polimorfismos, discriminar entre genotipos e identificar materiales originales y representativos de la variabilidad genética de una colección, con perspectivas de su uso en programas de mejoramiento genético, manejo de germoplasma y potencializar al máximo la conservación de la diversidad genética. Los marcadores moleculares seleccionados para este estudio con criterios que aseguren discriminación e indiferencia a factores medio ambientales al tener una naturaleza co-dominante, permitirá

eficientemente establecer el nivel de heterocigosidad en las colecciones evaluadas, establecer duplicados y asociar eventualmente la variabilidad genética con caracteres fenotípicos de interés para los mejoradores.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) "Dr. Enrique Ampuero Pareja", ubicado entre las coordenadas geográficas 02° 15' 15" de latitud Sur y 79° 49' de longitud Occidental a 17 msnm., en el km. 26 al Este de Guayaquil en la vía Durán-Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas. La investigación tuvo una duración de 16 meses.

La colecta del material vegetal de las 54 accesiones de guanábana se realizó en el lote 1, 6 y vivero de la colección de árboles frutales nativos del Ecuador del Programa de Fruticultura de la EELS, mientras que las muestras foliares de las 60 accesiones de mango fueron tomadas de la colección de frutas tropicales, establecida en el lote Teodomira de la Estación Experimental Portoviejo (EEP) situada a 01° 12' de latitud Sur y 80° 23' de longitud Occidental ubicada en la parroquia Lodana, cantón Santa Ana, provincia de Manabí. Ambas colecciones conservan germoplasmas procedentes de varias provincias del país.

Las características climáticas y edafológicas del área donde se mantienen las colecciones del germoplasma de guanábana y mango son las siguientes:

Guanábana1:

Temperatura promedio 24,6 ° C

Humedad relativa promedio 83 %

Precipitación anual 1398 mm

Tipo de suelo Vertic-Eutropepts

Textura Franco a Franco-arenosa

pH 5,5 a 6,5

Altitud 17 msnm

Mango2:

Clima Tropical seco

Temperatura media anual 26 ° C

Humedad relativa promedio 77 %

Precipitación medio anual 686,5 mm

Topografía Plana

Tipo de suelo Aluvial

Textura Franco-arcillosa pH 7,3

Altitud 47 msnm

El proceso de extracción de ADN de ambas especies se llevó a cabo en la EELS, mientras que la fase de caracterización molecular de ambas colecciones se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, ubicado entre las coordenadas geográficas 0° 22' 15" de latitud Sur y 78° 33' 14" de longitud Oeste en la parroquia Cutuglahua, cantón Mejía, provincia de Pichincha a 3050 msnm.

De los datos resultantes de los productos de amplificación mediante PCR tanto para los marcadores RAPDs (geles de agarosa) y SSRs (geles denaturantes de poliacrilamida) se generó una matriz binaria de datos (MBD), con el peso molecular de cada alelo, en donde la presencia de la banda es representada por la unidad (1) y cero (0) para la ausencia; con las cuales se realizó los siguientes análisis:

Determinación de marcadores polimórficos

Distancias genéticas

Análisis de conglomerados

Análisis de coancestrías

RESULTADOS

En la presente investigación se probaron dos protocolos de extracción de ADN: el método CTAB 2X desarrollado por VIRUEL y HORMAZA (2002) y el protocolo basado en el método CTAB 5X presentado por EMBRAPA (2010) con modificaciones en el uso de antioxidantes; determinándose que el método de extracción CTAB 5X produjo los mejores rendimientos y calidad de ADN. Para la extracción se utilizó una muestra de 1 g de hoja fresca de guanábana y 1 g de hoja macerada de mango por accesión, las cuales produjeron promedios de 79.82 ng/μl de ADN para guanábana y 56,05 ng/μl para mango al ser cuantificados en geles de agarosa y por fluometría. Los valores de cuantificación se detallan en los Cuadros 4.A y 5.A. Se obtuvo ADN de buena calidad y pureza, sin embargo, las muestras extraídas presentaban una alta concentración de sustancias fenólicas debido a la oxidación de las hojas colectadas, mostrándose una coloración gris o parda. Estas sustancias fueron eliminadas adicionando al buffer de extracción mercaptoetanol al 4 % y PVP (Polivinil pirrolidona) al 1 %, mejorando de esta manera las muestras de ADN.

Al realizar el test de integridad de las muestras de mango se observó la presencia de ARN, para esto fue necesario realizar la digestión de este ácido nucleico mediante un tratamiento con la enzima ARNasa, adicionando 40 μg/ml para eliminarlo.

Se realizó la validación del ADN tanto en guanábana como en mango, mediante marcadores moleculares RAPDs y SSRs respectivamente, obteniendo amplificación en la mayoría de muestras analizadas; esto demostró que el protocolo utilizado para cada tipo de marcador fue el adecuado tanto en concentraciones de los reactivos como en el programa de amplificación para los posteriores procesos de caracterización.

Se utilizó el primer RAPDs OPW-01 (5'-CTCAGTGTCC-3') obteniendo buenos patrones de bandeo para las muestras de guanábana a excepción de las accesiones G9P1, G17P1, G34P1, G41P2, G42P1 y G50P1 (Figura 4); para estas accesiones se volvió a realizar pruebas de amplificación, no obteniendo resultados y separándolas de la caracterización.

La presente investigación utilizó información generada de marcadores tipo microsatélites, útiles para caracterización genética en *A. cherimola*, (ESCRIBANO P. *et al.*, 2004-2007), proponiendo realizar la transferencia de estos marcadores para *A. muricata*. El screening inicial, se realizó con 17 marcadores SSRs (MORILLO E. y MIÑO G. 2010).

En las pruebas de transferibilidad hubieron ADNs que no amplificaron tanto en guanábana como en chirimoya; para verificar esto se realizaron gradientes de temperaturas de annealing, y así poder determinar la temperatura óptima de la amplificación, sin embargo no se obtuvieron resultados con los siguientes *primers*: SSR-1, SSR-4, SSR-16 y SSR-31.

De los *primers* SSRs que se evaluaron con los ADN's de las accesiones de guanábana, se pudo demostrar que la mayoría de estos se presentaron como monomórficos, por lo que se continuó la caracterización de la colección mediante el uso de marcadores RAPDs.

Posteriormente al realizar el pre-screening con 90 *primers* RAPDs, se seleccionaron 10, y se volvió a evaluar la capacidad de generar polimorfismos; con los que se obtuvo el mayor número de bandas fueron los siguientes: OPW-01, OPW-04, OPM-02, OPC-11, OPG-14, OPG-18, OPB-08, OPB-09, OPC-04, OPM-04; finalmente se procedió a la amplificación con cuatro materiales de *A. muricata* y un control negativo, de éstos se eligieron 6 *primers* que mostraron mayor número de bandas polimórficas para la caracterización molecular de la colección.

Estos seis *primers* RAPDs generaron un total de 39 bandas, de las cuales 24 fueron polimórficas; siendo el marcador OPG 18 el que mayor número de bandas amplificó.

CONCLUSIONES

El estudio de la variabilidad genética de 54 accesiones de guanábana (*A. muricata* L.) se determinó mediante los marcadores RAPDs: OPG-14, OPB-08, OPB-09, OPC-04, OPM-04 y OPG-18, este último fue el que mayor número de bandas generó, reflejado en un 88,89 % de polimorfismo. La variabilidad genética de 60 materiales de mango (*M. indica* L.) fue determinada a través de los marcadores microsatélites MiSHRS-1, MiSHRS-4, MiSHRS-18, MiSHRS-32, MiSHRS-36, MiSHRS-37, MiSHRS-39, MiSHRS-48, MITG-436-2 y MIAC-326. Los marcadores empleados determinaron bajo nivel de polimorfismos. El análisis de diversidad genética de las colecciones de guanábana y mango produjeron un valor de $H_t=0,40$ y $H_t=0,438$ respectivamente, demostrando que existe diversidad genética entre las accesiones analizadas; esto se demuestra en la formación de grupos genéticos. El dendrograma generado para *M. indica* L. por el método UPGMA, revela que existe una disimilitud de 0.1, demostrando una gran correlación entre accesiones, y por tanto la presencia de accesiones duplicadas. En el caso de *A. muricata* L. no existió duplicados. En cuanto a la distancia genética, en *M. indica* L. se determinó una alta similitud entre las accesiones de Chone y Daule y otra independiente del grupo, que fue el tipo del "Valle del Río Portoviejo". En cuanto a los tipos de mango de "Chupar" y "Manzana" se presentan como un mismo genotipo, mientras que los tipos "Chico y grande", y "Miguelillo" presentan mayor distancia genética.

REFERENCIAS

- AAGAARD J., KRUTOVSKII V y STRAUSS H. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81:69-78. En línea. Consultado el 20 de Febrero del 2011. Disponible en: http://www.cof.orst.edu/coops/tbgrc/publications/Aagard_1998_Heredity.pdf
- AVILAN L. y RENGIFO C. 1990. EL MANGO (*Mangifera indica* L.). 1ed. Chacaito. Caracas. Venezuela, Editorial América. 401 p.
- AZOFEIFA A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242. En línea. Consultado el 20 de Diciembre del 2011. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf
- ARMOUR A., NEUMAN R., GOBERT S. y JEFFREYS A. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3(4):599-605. Consultado el 23 de Febrero del 2011. En línea. Disponible en: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/3/4/599.short>
- BACKELJAU T., DE BRUN L., DE WOLF H., JORDAENS K., DONGEN S., VERHAGEN R. y WINNEPENNINCKX B. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11:119-130. En línea. Consultado el 20 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1096-0031.1995.tb00083.x/abstract>
- BARBARÁ T., PALMA-SILVA C., PAGGI G. y BERED F. 2007. Cross species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* 16, 3759-3767.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1998. Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular. Tipificación genética. Manual de capacitación. 2da Ed. Lima-Perú. En línea. Consultado el 25 de Febrero del 2011. Disponible en: http://books.google.com.pe/books?id=ZmxTOpPjHZIC&pg=PP7&dq=microsatelites+en+biologia+molecular+de+plantas&hl=es&ei=CJJWT6BeyOxAqWtpdoJ&sa=X&oi=book_result&ct=bookthumbnail&resnum=2&ved=0CDkQ6wEwAQ#v=onepage&q&f=false
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL CIAT y CORPORACIÓN BIOTEC. 2002. Taller: Guanábana para Colombia y el mundo. Optimización de la cadena productiva. Ed. CABRA J, SÁNCHEZ M y SCHOONHOVEN A. 1ed. Colombia. Ediciones Norma. 56 p.
- CHICAIZA G., PUCHA M. y URIGUEN P. 2003. Proyecto para la producción y exportación de la guanábana en la Hacienda "María Dolores" del Cantón El Guabo-Provincia de El Oro. Tesis. ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA (ESPOL). En línea. Consultado el 2 de Marzo del 2011. Disponible en: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-32243.pdf
- COLTMAN D., BOWEN D y WEITH J. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina* concolour) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology* 5:161-163. En línea. Consultado el 25 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00303.x/abstract>
- COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD. CONABIO 1991. *Annona muricata* L. En línea. Consultado el 20 de Octubre de 2011. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/árboles/doctos/5-

annon2m.pdf#search=%22ORIGEN%20Y%20DISTRIBUCION%20DE%20LA%20GUANABANA%22

- CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL CCI. 1998. Mango, perfil del producto. Boletín informativo No 1. En línea. Consultado el 28 de Abril del 2011. Disponible en: http://www.cci.org.co/cci/cci_x/Sim/Perfil%20de%20Productos/perfilmango1.html
- CRONQUIST A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. En línea. Consultado el 5 de Diciembre 2011. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx/>
- DOYLE J.J and DOYLE J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. En línea. Consultado el 15 de Diciembre del 2011. Disponible en http://www.fs.fed.us/psw/programs/nfgel/protocols/rapid_ctabdna.html
- ESCRIBANO P., VIRUEL M. y HORMAZA I. 2007. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. Molecular Ecology Resources. E.E. la Mayora-CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga 29750, Spain.
- FAO. 2006. Guanábana (*Annona muricata*). Fichas Técnicas. Productos frescos y procesados. En línea. Consultado el 15 de Noviembre del 2011. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/GUANABANA.HTM
- FENDRI M. 2008. En línea. Uso de marcadores microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de las variedades de olivo del banco de germoplasma de "Boughara" (Sfax-Túnez). Tesis de Master, Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina, 99p. En línea. Disponible en http://portail2.reseau-concept.net/Upload/ciheam/fichiers/Thesis_Mr_FENDRI.pdf. Consultado el 14 de Mayo de 2010.
- FERREIRA M. y GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasil. 220 p.