

Artículo de revisión**MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AL MANEJO DE BANCOS DE GERMOPLASMA.**

Msc. Leixys Rodríguez Rodríguez

RESUMEN

El empleo de la tecnología de marcadores moleculares es cada vez más frecuente en el manejo de los Bancos de Germoplasma. Estas herramientas permiten la estimación de la singularidad de una fuente de variación genética entre accesiones y dentro de ellas sin las influencias ambientales, lo que facilita el proceso de caracterización de la diversidad, la detección de duplicados, la demostración de la identidad genética de los materiales conservados, el apoyo a programas de mejoramiento y las estrategias de conservación más efectivas, así como facilitar el trabajo con las semillas. Sin embargo, el uso de la tecnología molecular sigue estando fuera del alcance de algunas instituciones, ya que requiere avanzadas instalaciones de laboratorio, capacidad técnica y además su implementación puede resultar costosa. El siguiente artículo actualiza sobre el uso de los marcadores en el trabajo cotidiano de los Bancos de Germoplasma.

Palabras clave: Banco de Germoplasma, marcadores moleculares, colecciones vegetales

Molecular markers applied to the management of the genebank.**ABSTRACT**

The use of molecular markers technology is more frequently applied to the GeneBanks management. Those tools detect the singularity of a source of genetic variation into and between accessions without the environmental influence, which facilitates the biodiversity characterization process, detections of duplicates, validity the genetic identity of the preserved materials, support the effectively of breeding programs and the conservations strategies as well as facilitates the seed management. However, the molecular markers technology still long away for some institutions because it requires advanced installations, qualified technical staff and its implementation could be expensive. This work pretends to updating about the routinely use of molecular markers into GeneBanks management.

Keywords: GeneBank, molecular markers, plant collections

Msc. Leixys Rodríguez Rodríguez, Investigador Agregado del Departamento de Recursos Fitogenéticos y Semillas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 188 No. 38754 entre 397 y Linderos, Santiago de la Vegas, La Habana, Cuba. E- mail: genetica2@inifat.co.cu

INTRODUCCION

La diversidad genética acredita a las especies como donantes potenciales de genes de interés y propicia la adaptación a las condiciones ambientales de las poblaciones naturales. Su explotación ha propiciado el desarrollo de nuevos cultivares mejor adaptados a los estreses bióticos y abióticos, así como a las exigencias de los consumidores, mediante el auxilio de programas de mejoramiento o de las herramientas biotecnológicas. Sin embargo, muchos países cambiaron su proyección agrícola con la llegada de la llamada Revolución Verde a mediados de 1960s. La mecanización, el uso intensivo de plaguicidas, herbicidas, fertilizantes y otros, propiciaron la aparición del monocultivo y por ende, la erosión genética (pérdida de la diversidad genética), la desaparición de genes y la extinción de cultivares localmente adaptados (Govindaraj *et al.*, 2015).

En las últimas décadas cobra renovada importancia el manejo y uso de la diversidad como una alternativa para dar respuestas al futuro. Mantener los reservorios de especies y cultivares es uno de los principios de la nueva agricultura y los bancos de fitogermoplasma son claves en el aseguramiento de la protección de tal diversidad, con lo que se garantiza la accesibilidad futura y se proporcionan recursos fitogenéticos a las investigaciones y los mejoradores (Van Treuren y Hintum, 2014).

Cuba comprende la importancia de conservar los recursos fitogenéticos propios y foráneos. Como meta para el 2020 pretende lograr conservar hasta el 40 % *ex situ* y hasta el 50 % *in situ* de la diversidad genética de las especies útiles para la alimentación y la agricultura, así como asegurar que un 60 % de la diversidad genética autóctona se encuentre conservada *in situ* (CITMA, 2016).

Es por ello que el Ministerio de la Agricultura (MINAG) tiene la tarea prioritaria de crear el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CNRF) de Cuba, y el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT) ha sido la institución seleccionada para llevar a cabo la tarea. El proyecto abarcará diversas instalaciones y laboratorios incluyendo tecnologías de avanzada como son la biología molecular y las herramientas moleculares.

Muchas son las ventajas de aplicar las herramientas moleculares al trabajo de conservación de los Recursos Fitogenéticos. El empleo de los marcadores se ha extendido hasta la posibilidad de crear asociaciones con caracteres, la construcción de mapas genéticos con vistas a conocer la base genética y la organización genómica de caracteres de interés; el mejoramiento asistido por marcadores (MAS), la detección de duplicados y en el establecimiento de colecciones núcleo (Van Treuren y Hintum, 2014; Govindaraj *et al.*, 2015 y Wambugu *et al.*, 2018).

Los marcadores moleculares posibilitan, para los programas de mejoramiento, la selección de líneas parentales más adecuadas, demostrar la identidad de determinada variedad o determinar la pureza varietal, los estudios de heterosis, la identificación de regiones genómicas bajo selección y el retrocruce asistido por marcadores (Van Treuren y Hintum, 2014; Govindaraj *et al.*, 2015 y Joshi, 2017). Los marcadores moleculares también se emplean como herramientas para detectar la contaminación y la deriva genética en la estimación de la singularidad de una fuente de variación, entre accesiones y dentro de ellas, sin tener en cuenta la influencia del ambiente (FAO, 2014).

No obstante todas las ventajas y facilidades, el uso de la tecnología molecular sigue estando fuera del alcance de algunas instituciones, ya que requiere instalaciones de laboratorio avanzadas y de personal técnico altamente capacitado, además puede ser una tecnología costosa, especialmente en países en vías de desarrollo donde se deben establecer desde el principio las herramientas moleculares específicas del genoma (FAO, 2014). Cuba carece de una instalación de este tipo, por ello se pretende actualizar sobre los avances de la tecnología, específicamente aplicados a la conservación de los recursos fitogenéticos.

DESARROLLO

Las técnicas de Biología Molecular han revolucionado el equipamiento estándar de muchos laboratorios; no obstante, para el caso específico de los Bancos de Germoplasma no existe una sola técnica molecular que resuelva todos los problemas a los que se enfrentan los curadores, o sea, varias técnicas son necesarias así como su complementación; sin embargo se han identificado algunas técnicas más apropiadas que otras para aplicaciones específicas.

En una situación ideal, el marcador (o los marcadores) más apropiado, debe ser elegido independientemente a las limitaciones en cuanto a tiempo o recursos, pero es precisamente el acceso a equipos o fondos la causa determinante para su elección (Spooner *et al.*, 2005). Un marcador molecular *ideal* debe ser altamente polimórfico, de herencia codominante, estar representado con frecuencia en el genoma vegetal, debe tener un comportamiento selectivo neutral, ser de fácil acceso (simple, rápido, barato), altamente reproducible y permitir el fácil intercambio de datos entre los laboratorios (Mishra *et al.* 2014).

Existen diferentes tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos y marcadores basados en el ADN (ácido desoxirribonucleico) aunque éstos últimos son los más empleados actualmente debido a las ventajas de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa del inglés *Polimerase Chain Reaction*), a saber: su simplicidad, las posibilidades de desnaturalización del producto en una electroforesis de gel para determinar la talla de los alelos, así como el alto grado de información que brinda el número de alelos por locus (Mishra *et al.*, 2014).

Marcadores moleculares del ADN.

Un marcador molecular puede ser definido como locus genómico que se detecta mediante un ensayo con cebadores específicos, donde es posible distinguir certeramente los caracteres cromosómicos que dicho marcador representa (en caso de estar presente), así como las regiones flanqueantes de los extremos 3' y 5'. Los marcadores surgen de diferentes tipos de mutaciones del ADN como mutaciones de sustitución (mutaciones puntuales), rea-arreglos (inserciones o supresiones) o errores durante la replicación del ADN repetido en tándem. Estos marcadores son neutrales porque se localizan con frecuencia en regiones no codificantes del ADN cromosómico, son ilimitados en cuanto a número y son independientes del ambiente o de la etapa de desarrollo fisiológico de la planta (Govindaraj *et al.*, 2015).

Tres clases de marcadores son establecidas según el método de detección empleado: marcadores basados en hibridación, en la PCR y basados en la secuencia del ADN. Para el trabajo del Banco de Germoplasma son de interés los dos últimos, ya que los métodos basados en la hibridación pueden ser muy caros, requieren mucho tiempo y trabajo, así como

necesitan grandes cantidades de ADN, para finalmente detectar un polimorfismo limitado entre especies relacionadas (Spooner *et al.*, 2005). Existen otros tipos de clasificaciones para los marcadores moleculares del ADN además del método de detección, ellos se clasifican según el modo de acción (codominante y dominante) y según el modo de transmisión (herencia de orgánulos paternos, herencia de orgánulos maternos, herencia nuclear bi-parental o de herencia nuclear materna) (Nadeem *et al.*, 2018).

Marcadores del ADN basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) ADN polimórfico amplificado al azar (**RAPD**, del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) son marcadores que emplean iniciadores arbitrarios (al azar) de aproximadamente 10 pb que actúan como cebador sentido (*forward*) y cebador antisentido (*backward*), y que originan copias múltiples de las cadenas del ADN. Los productos RAPD se visualizan en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Spooner *et al.*; 2005 y Govindaraj *et al.*, 2015).

Variantes de las técnicas RAPDs incluyen las reacciones en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios (**AP-PCR**, del inglés *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*), de similar principio pero con cebadores más largos y la amplificación de la huella dactilar del ADN (**DAF**, del inglés *DNA Amplification Fingerprinting*) que utilizan cebadores más pequeños 5-8 pb para generar un mayor número de fragmentos (Spooner *et al.*, 2005).

Fortalezas: Rápidos, simples y económicos; un solo cebador origina múltiples loci, solo

requiere pequeñas cantidades de ADN, visualización mediante fluorescencia, no requieren conocimiento previo del genoma y presentan facilidades para la automatización (Mishra *et al.*, 2014).

Limitaciones: Baja reproducibilidad, por ello requieren una buena estandarización de los procedimientos experimentales, necesitan ADN libre de contaminantes, no son marcadores dominantes (no locus específicos), por lo que los fragmentos de tallas similares no son necesariamente homólogos.

b) Repeticiones de secuencias simples internas (**ISSR**, del inglés *Inter Simple Sequence Repeat*): la amplificación de fragmentos de ADN localizados entre dos regiones de microsatélites¹ idénticas separadas por una distancia amplificable y orientadas de manera opuesta. Las repeticiones utilizadas como cebadores para los ISSR pueden ser bi-nucleótidas, tri-nucleótidas, tetra-nucleótidas o penta-nucleótidas. Los marcadores ISSR utilizan cebadores más extensos (15–30 pb) que los cebadores RAPD (10 pb), lo que posibilita una mayor temperatura de acoplamiento (hasta 65 °C) y por tanto una mayor exactitud. Los productos de la amplificación son usualmente de 200-2000 pb y pueden ser detectados por electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida (Mishra *et al.*, 2014).

Otras técnicas relacionadas con análisis ISSR incluyen la Reacción de amplificación de

¹ Los microsatélites son regiones del genoma en las que una pequeña secuencia (de uno a seis pares de bases) se repite un cierto número de veces a lo largo de todo el genoma (Omondi *et al.*, 2016).

único cebador (**SPAR**, del inglés *Single Primer Amplification Reaction*) y Amplificación Directa de Región Minisatélite del ADN (**DAMD**, del inglés *Directed Amplification of Minisatellite DNA*) (Spooner *et al.*; 2005 y Govindaraj *et al.*, 2015).

Fortalezas: No requiere previo conocimiento de la secuencia para el diseño de los cebadores, requiere pequeñas cantidades de ADN, simples, no requieren radioactividad, se encuentran distribuidos azarosamente en el genoma, altamente polimórficos.

Limitaciones: Secuencias con tallas similares pueden no ser homólogas, presentan problemas de reproducibilidad, herencia dominante.

- c) Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (**AFLP**, del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*): se basan en la combinación de las principales técnicas de análisis, dígase la digestión del ADN a través de enzimas de restricción y la tecnología de la PCR. La clave de los marcadores AFLP es su capacidad para “la representación genómica”: la revisión simultánea de regiones representativas del ADN distribuidas de manera azarosa en el genoma (Mishra *et al.*, 2014 y Govindaraj *et al.*, 2015).

Fortalezas: altamente reproducibles, son abundantes en el genoma, no requieren previo conocimiento de la secuencia del ADN y permiten analizar grandes números de loci polimórficos simultáneamente.

Limitaciones: es una técnica trabajosa, requiere de ADN libre de inhibidores (buena calidad) y son generalmente marcadores

dominantes por lo que no permiten diferenciar homocigóticos dominantes de heterocigóticos. Aunque los AFLPs pueden convertirse a un simple ensayo de la PCR, la conversión pudiera ser complicada de interpretar ya que las bandas individuales pueden provenir de múltiples fragmentos. La técnica requiere el uso de geles de poliacrilamida en combinación con tinciones de AgNO₃, radioactividad o métodos de fluorescencia para la detección, estos son más caros y laboriosos (Mishra *et al.*, 2014).

Marcadores basados en la secuencia del ADN

- d) Los microsátélites (**SSR**, **STR** o **SSLPs** por sus acrónimos en inglés para *Simple Sequence Repeat*, *Short Tandem Repeat* o *Simple Sequence Length Polymorphisms*) son un juego de secuencias altamente variables y de amplia distribución en el genoma de eucariotas (miles de veces). Su número de unidades repetitivas varía entre especies y pueden ser de motivos básicos: mono: A, T; Di: AT, GA; Tri: AGG; Tetra: AAAC. Los microsátélites presentan altos niveles de polimorfismo, los polimorfismos asociados con un locus específico vienen dados por la variación en la longitud del microsátélite, que a su vez depende del número de repeticiones del motivo básico (Mondini *et al.*, 2009).

La reacción PCR se realiza en presencia del cebador sentido (dirección 5´-3´) y del cebador antisentido (dirección 3´-5´). Los polimorfismos son identificados mediante la construcción de cebadores que flanquean las regiones del microsátélite, tales regiones de flaqueo son regiones conservadas entre especies, inclusive entre niveles taxonómicos mayores (Mishra *et al.*, 2014).

Fortalezas: requiere pocas cantidades de ADN, altamente polimórficos y genotipo-específicos, abundantes, técnica robusta y reproducible, de herencia codominante.

Limitaciones: alto costo, dependen de la disponibilidad de cebadores para la especie, las mutaciones en los sitios de acoplamiento de los cebadores pueden producir alelos nulos, no amplificaciones, que pueden conducir a errores de genotipo (Spooner *et al.*, 2005 y Govindaraj *et al.*, 2015).

e) Polimorfismo de nucleótido único (**SNP**, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*): son cambios de una base o pequeñas inserciones o deleciones en fragmentos de ADN homólogos. Los SNPs se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie, son los marcadores más abundantes del genoma (Mondini *et al.*, 2009).

Este tipo de polimorfismo tiene una gran importancia biológica, ya que determinan la mayor parte de la variabilidad genética de los individuos, causando muchas de las diferencias fenotípicas (observables) de los mismos. Generalmente prevalecen en regiones no codificantes del genoma; cuando están presentes en las regiones codificantes pueden generar mutaciones que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos (mutaciones no sinónimas) o cambios que no alteran la secuencia de aminoácidos (mutaciones sinónimas). La mayoría de los análisis de genotipo mediante SNP están basados en: hibridación alelo-específica, ligamiento de oligonucleótidos, extensión de cebadores y clivaje invasivo (Mondini *et al.*, 2009).

Fortalezas: genera gran cantidad de información, posible automatización. Estos marcadores resultan muy interesantes para la identificación rápida de cultivos y la construcción de mapas genéticos ultradensos (Mondini *et al.*, 2009).

Limitaciones: costosos, requieren alta capacitación del personal técnico, no están disponibles para especies con genomas poco estudiados (especies subutilizadas) (Wambugu *et al.*, 2018).

Aplicaciones en el Banco de Germoplasma.

Caracterización de la diversidad.

La caracterización de la variación genética entre poblaciones naturales y entre líneas de mejoramiento se considera crucial para la conservación y explotación efectivas de los recursos fitogenéticos. En este sentido, marcadores como los SSR y SNP han desempeñado un importante papel ya que han facilitado el reconocimiento de “cuellos de botella” durante estudios de la caracterización para la biodiversidad en cultivos como frijoles (Gioia *et al.*, 2013; Schmutz *et al.* 2014 y Wambugu *et al.*, 2018).

Detección de duplicados.

Es muy común presentar duplicados en las colecciones de germoplasma que se traduce en un costo de mantención y una limitante para la adecuada explotación de la diversidad. Mediante la caracterización fenotípica no es posible la detección de duplicados, de ahí la importancia de aplicar los marcadores moleculares. Marcadores como los RAPDs, SSR y AFLPs han permitido la detección de duplicados en cultivos como la cebada, trigo, sorgo y frijoles silvestres (Joshi, 2017).

Identidad genética.

En el caso de colecciones conservadas durante largos periodos de tiempo en cultivo de tejidos, los marcadores posibilitan detectar si ha existido una pérdida de la integridad del material genético. De esta manera es posible detectar debilidades u errores en el proceso de conservación del germoplasma. Los marcadores SNP son muy útiles, en este sentido se han desarrollado investigaciones en cultivos como la papa (Ellis *et al.*, 2018). Otros trabajos también han empleado SSRs para evaluar la estabilidad de semillas ortodoxas criopreservadas durante determinados periodos de tiempo (Cejas *et al.*, 2013).

Detección de organismos genéticamente modificados (OGM).

El desarrollo de los OGMs ha revolucionado la agricultura en las últimas décadas, pese a los detractores y campañas publicitarias en contra. De ahí, la importancia de desarrollar parámetros analíticos tanto cuantitativos como cualitativos para la detección de los OGM. Actualmente, herramientas bioanalíticas como PCR y PCR en tiempo real se utilizan de manera rutinaria para la detección de ADN/proteínas (Barbau-Piednoir *et al.*, 2014 y Kamle y Ali, 2013).

Banco de ADN.

Este tipo de banco dentro del Banco de Germoplasma es un repositorio de ADN con fines generalmente investigativos. Su objetivo es la conservación de diferentes tipos de ADN extraídos de los recursos fitogenéticos y conservados a -40 °C. La calidad del ADN debe ser idónea para complejos estudios a nivel molecular, por lo que de esta manera se garantiza el almacenaje seguro del material genético a largo plazo, como una estrategia complementaria a los métodos de conservación establecidos (Joshi, 2017).

Apoyo al establecimiento de estrategias de conservación de especies amenazadas.

SSR y AFLPs han sido exitosamente utilizados para diferentes especies como *Agave angustifolia*, *Arabis glabra*, *Calystegia soldanella*, *Cirsium heterophyllum*, *Iberis amara*, *Tricyrtis sishiiana*, *Trollius europaeus*, *Galium catalinense* subespecie *acrispum* (Whitlock *et al.*, 2016).

Asistencia al pre-mejoramiento y mejoramiento genético de las especies.

Una parte significativa de las colecciones de los bancos de germoplasma está constituida por especies silvestres que poseen genes de interés para los mejoradores. La introducción de estos genes mediante el cruzamiento sexual pudiera ser difícil porque generalmente, los genes silvestres de interés están estrechamente ligados a genes indeseables que aportan baja calidad y con efecto pleiotropico. Modelos predictivos emplean los marcadores SNP para determinar los alelos con efecto pleiotropico deletéreo en las etapas tempranas de los programas de mejoramiento (Wambugu *et al.*, 2018).

Los marcadores son una herramienta para la identificación y mapeo de caracteres durante el proceso de selección (**MAS**, del inglés *Marker-assisted selection*) y para determinar con exactitud parentales deseables (Mishra *et al.*, 2014 y Bassi *et al.*, 2015), inclusive los marcadores en combinación con complejos análisis estadísticos han posibilitado la predicción de características esperadas para ambientes determinados en cultivos como el trigo (Crossa *et al.*, 2016).

Determinante de la edad de semillas.

Los avances en la biología molecular y las tecnologías de secuenciación de siguiente generación han facilitado la interpretación de señales de envejecimiento en las semillas de los

Bancos de Germoplasma mediante los análisis genómicos, de transcripción, proteómicos y metabólicos (Fu *et al.*, 2015). En cultivos como la cebada y el trigo se han detectado loci relacionados con la longevidad de la semilla (Börner *et al.*, 2012).

Certificar salud de semillas (diagnóstico de enfermedades).

Durante el intercambio de germoplasma y de colecciones, existe un riesgo de introducción de patógenos. La detección y el diagnóstico tempranos de los patógenos es indispensable para garantizar la conservación e intercambio de germoplasma saludable. Los marcadores moleculares posibilitan su rápida identificación evadiendo métodos basados en el cultivo y evitando con ello problemas de propagación. Por otra parte, la propagación vegetativa de especies posibilita la transmisión de bacterias, virus y viroides (Joshi, 2017).

Proyecciones futuras.

Las tecnologías moleculares no se detienen, a cada instante se renuevan y son publicadas nuevas técnicas con sus facilidades y limitaciones específicas. Para el trabajo futuro de los Bancos de Germoplasma se proyecta incursionar en las técnicas de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing Techniques*, NGS). Entre ellas existen algunas independientes de la PCR (conocidas como 3ra generación de técnicas de secuenciación) (Van Treuren y Hintum, 2014) que emplean métodos de detección basados en señales eléctricas directas (Clarke *et al.*, 2009) y métodos de secuenciación del ARN, sin tener que convertir ARN en ADNc (Ozsolak *et al.*, 2009).

Otra tecnología diferente para analizar moléculas sencillas de ADN fue publicada en el 2012 y se basa en la secuenciación por nanoporos (Van

Treuren y Hintum, 2014). Muchas de estas tecnologías se están introduciendo al trabajo de los Bancos de Germoplasma, por lo que se espera que revolucionen no solo las investigaciones en el campo de la genómica, sino también en el manejo de las colecciones de recursos fitogenéticos, así como los servicios brindados (FAO, 2014 y Van Treuren y Hintum, 2014).

Con vistas a la predicción más acertada de la expresión de caracteres bajo determinadas condiciones ambientales (GxE) son recomendados los métodos de genotipado por secuenciación (del inglés *genotyping by sequencing* GBS), los cuales combinados con complejos análisis estadísticos han posibilitado establecer modelos que predigan el comportamiento de determinados caracteres en más de un ambiente para los cultivos (Crossa *et al.*, 2016). El genotipado por secuenciación es una técnica desarrollada por el Laboratorio Buckler bajo la plataforma Illumina NGS, que ha permitido reducir costos y analizar el genoma de numerosas especies detectando altos niveles de diversidad. La técnica GBS fue desarrollada básicamente para estudiar asociaciones de alta resolución en maíz y hoy en día su empleo se ha extendido a otros cultivos de genoma complejo, con resultados satisfactorios en la caracterización del germoplasma, estudios poblacionales y el mejoramiento genético (Nadeem *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Las perspectivas para el manejo de Bancos de Germoplasma y el Mejoramiento Vegetal han cambiado radicalmente con la aparición de los marcadores moleculares en los 1980s. Diferentes tipos de marcadores existen actualmente junto con nuevas tecnologías de secuenciación y están disponibles para el manejo de las colecciones *ex-situ*. Tal relación ha sido de doble sentido

porque los progresos en el mejoramiento molecular, la genética, la selección genómica y la edición genómica han contribuido igualmente a comprender los marcadores moleculares y el acceso a la diversidad disponible. Sin embargo, la utilización de estas tecnologías no es justamente explotada debido a los presupuestos limitados de los Bancos de Germoplasma y los cuestionamientos de su efecto práctico en las diferentes actividades del banco. En este sentido, muchos de los estudios sobre marcadores moleculares en las plantas se limitan a proveer información sobre su identidad sin profundizar en su aplicación práctica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbau-Piednoir, E.; Stragier, P.; Roosens, N.; Mazzara, M.; Savini, C.; Van den Eede, G. y Van den Bulcke, M. (2014). Inter-laboratory testing of GMO detection by combinatory SYBR@Green PCR screening (CoSYPS). *Food Anal. Methods*, 7:1719–1728.
- Bassi, F. M.; Bentley, A.R.; Charmet, G.; Ortiz, R. y Crossa, J. (2015). Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Science*, 1–14. Elsevier Ireland Ltd, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.021>.
- Börner, A.; Kkhlestkina, E.; Chebotar, S.; Nagel, M.; Rehman Arif, B.; Neumann, M. A.; Kobiljski, K.; Lohwasser, M. y Sröder, U. (2012). Molecular markers in management of *ex-situ* PGR – A case study. *J. Biosci.*, 37: 871–77. doi:10.1007/s12038-012-9250-2. www.ias.ac.in/jbiosci Published.
- Cejas, I.; Méndez, R.; Villalobos, A.; Aragón, C.; Engelmann, F.; Carputo, D.; Aversano, R.; Edel Martínez, M. y Lorenzo, J. C. (2013). Phenotypic and molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* plants from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 844–49. www.scirp.org/journal/ajps
- CITMA (2016). Cuba: metas nacionales para la diversidad biológica 2016-2020, 31 pp.
- Clarke, J.; Wu, H.C.; Jayasinghe, L.; Patel, A.; Reid, S. y Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat. Nanotechnol.*, 4, 265–270.
- Crossa, J.; Jarquín, D.; Franco, J.; Pérez-Rodríguez, P.; Burgueño, J.; Saint-Pierre, C.; and Vikram P. (2016). Genomic prediction of Gene Bank wheat landraces. *G3 Genes Genomes Genetics*, 6: 1819–34. doi:10.1534/g3.116.029637.
- Ellis, D.; Chavez, O.; Coombs, J.; Soto, J.; Gomez, R.; Douches, D.; Panta, A.; Silvestre, R. y Anglin, N.L. (2018). Genetic identity in genebanks: application of the SolCAP 12K array fingerprinting and diversity analysis in the global in trust potato collection. *Genome*, 61:523-537.
- FAO (2014). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada. Roma; 182 pp, ISBN 978-92-5-308262-9.
- Fu, Yong-bi; Ahmed, Z. y Diederichsen, A. (2015). Towards a better monitoring of seed ageing under *ex-situ* seed conservation. *Conserv. Physiol.*, 3: 1–16.
- Gioia, T.; Logozzo, G.; Attene, G.; Bellucci, E.; Benedettelli, S.; Papa, R. y Spagnoletti, P. (2013). Evidence for introduction bottleneck and extensive inter-gene pool (Mesoamerica X Andes) hybridization in the European common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm. *PLoS ONE* 8 (10): e75974. doi:10.1371/journal.pone.0075974.
- Govindaraj, M.; Vetriventhan, M. y Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent

- advances: An overview of its analytical perspectives. Genetics Research International, 14 pp.
- Joshi, B. K. (2017): Biotechnology for conservation and utilization of agricultural plant genetic resources in Nepal. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 3: 49–59.
- Kamle, S. y Ali, Sh. (2013). Genetically modified crops: Detection strategies and biosafety issues. *Gene*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.107>.
- Mishra, K. K.; Fougat, R. S.; Ballani, A.; Thakur, V.; Yachana, J. y Madhumati, B. (2014). Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int. J. Pure App. Biosci.*, 2 (1): 169-188. ISSN: 2320 – 7051.
- Mondini, L.; Noorani, A. y Pagnotta, M.A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1, 19-35. ISSN 1424-2818.
- Nadeem, M.A.; Nawaz, M.A.; Qasim, M.; Doğan, Y.; Comertpay, G.; Yıldız, M. y Hatipoğlu, R. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32 (2): 261–85. doi:10.1080/13102818.2017.1400401.
- Omondi, E. O.; Debener, T.; Linde, M.; Abukutsa-Onyango, M.; Dinssa, F.F. y Winkelmann, T. (2016). Molecular Markers for Genetic Diversity Studies in African Leafy Vegetables. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7, 188-197.
- Ozsolak, F.; Platt, A.R.; Jones, D.R.; Reifengerger, J.G.; Sass, L.E.; McInerney, P.; Thompson, J.F.; Bowers, J.; Jarosz, M. y Milos, P.M. (2009). Direct RNA sequencing. *Nature*, 461: 814-818.
- Spooner, D.; Van Treuren, R. y Vicente, de M.C. (2005). Molecular markers for Gene bank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. 136 pp.
- Van Treuren, R. van y van Hintum, T.J.L. (2014). Next-generation genebanking: plant genetic resources management and utilization in the sequencing era. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 12(3): 298-307. ISSN 1479-2621.
- Wambugu, P.W.; Ndjiondjop, M.-N. y Henry, R.J. (2018). Role of Genomics in Promoting the Utilization of Plant Genetic Resources in Genebanks. *Briefings in Functional Genomics*, 1–9. doi:10.1093/bfpg/ely014.
- Whitlock, R.; Hipperson, H.; Thompson, D.B.A.; Butlin, R.K. y Burke, T. (2016). Consequences of *in-situ* strategies for the conservation of plant genetic diversity. *Biological Conservation*, 203: 134-142.

Fecha de recepción: 13 diciembre 2018

Fecha de aceptación: 23 mayo 2019

Agrotecnia de Cuba
ISSN impresa: 0568-3114
ISSN digital: 2414- 4673
<http://www.ausuc.co.cu>

