

MAPEO DE CROMOSOMAS EN CÉLULAS EUCARIOTICAS

OSCAR EDUARDO CHECA CORAL *

INTRODUCCIÓN

El mapeo de cromosomas es un tópico de especial importancia para genetistas, fitomejoradores e investigadores interesados en conocer los diferentes aspectos relacionados con los métodos que se utilizan en la determinación de la posición de los genes en los cromosomas. Para una mayor comprensión de los procedimientos de mapeo se ha incluido la definición de algunos conceptos importantes. Los métodos de mapeo mediante análisis de poblaciones segregantes y uso de aneuploides, se ilustran con ejemplos con el objeto de dar mayor claridad a los procesos. Además se presentan algunos procesos básicos del mapeo mediante el uso de RFLPs.

Mapeo genético

En términos generales se entiende por mapeo genético la ubicación espacial de un gen en una región específica del cromosoma. Además el mapeo genético tiene que ver con distancias en el mapa y secuencias de genes (Calderón, 1990).

* Profesor Asistente Facultad Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

Importancia y uso de los mapas genéticos

Entre otros, se pueden destacar los siguientes:

- Pueden ser utilizados en la producción de los resultados entre dihíbridos.
- Predicción de los resultados de una cruce de prueba con trihíbridos.
- Permite que los investigadores sepan cuáles son los genes conocidos disponibles en los bancos de germoplasma.
- El conocimiento de los mapas genéticos puede servir para seleccionar estrategias en el mejoramiento de una especie.

Bases del mapeo de cromosomas

En *Drosophila*, los genes para los caracteres mutantes, ojos blancos, cuerpo amarillo y alas grabadas están ligados al sexo. Un apareamiento apropiado revela que los genes blancos y amarillo consistentemente muestran cerca del 1% del entrecruzamiento. Pero, el carácter blanco y alas grabadas dan cerca del 20%. Resultados de esta clase son típicos en *Drosophila* y para otros organismos a quienes se les ha estudiado el ligamiento parental. El entrecruzamiento entre pares particulares de genes ligados ocurre para ciertas características y frecuencias estables, pero estas frecuencias pueden diferir ampliamente dependiendo del par de genes involucrados. Esta generalización puede al menos ser consistente con la conclusión que cada gen tiene un particular y bien definido locus en su cromosoma. Tal conclusión está respaldada por el hecho de que los valores de entrecruza pueden ser utilizados para demostrar un orden de serie definido para los genes en un cromosoma y siempre como una base para mapear distancias entre genes ligados (Owen, 1965).

Las distancias genéticas corresponde a la frecuencia de recombinación intracromosómica debida al entrecruzamiento y expresada en porcentaje. La distancia entre genes se llama simplemente unidades de mapa o centimorgans (Owen, 1965).

Cada quiasma produce 50% de productos de entrecruzamiento de intercambio que equivale a 50 unidades de mapeo. Si se conoce el número promedio de quiasmas para un par de cromosomas, la longitud total del mapa para ese grupo de enlaces puede calcularse por: (Stansfield, 1990), Longitud total = media de quiasmas x 50

Mapeo de distancias

Los resultados de cruzamientos que involucran genes ligados no proveen las bases para estimar las distancias entre esos genes en términos de medidas lineales estándar. Sin embargo, los cromosomas pueden ser mapeados efectivamente en términos de porcentaje del entrecruzamiento obtenido en experimentos genéticos. En este sistema, una unidad de distancia de mapa entre genes ligados es el espacio en el cual el 1% de entrecruzamiento ha ocurrido.

Así el 5% de entrecruzamiento entre los genes A y B establece que ellos están situados a cinco unidades de distancia en el mapa dentro de su cromosoma.

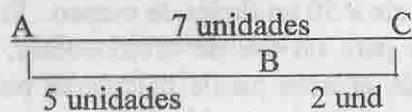
A ----- 5 unidades ----- B

Orden de los genes en el cromosoma

La clase de razonamiento utilizado en el mapeo de cromosomas puede ser ilustrada si se asume que el gen A y un tercer gen ligado que lo llamamos C, tienen 7% de entrecruzamiento y que B y C muestran por datos de entrecruce 12 unidades de distancia. Esto permite deducir que A está situado entre C y B dentro de su cromosoma.

C 7 unidades A 5 unidades B
|-----|
12 unidades

Si B y C dan 2% de entrecruzamiento, se concluye que B está entre A y C.



Doble entrecruzamiento

Antes de proceder al análisis de datos de entrecruzas, se requiere considerar un escollo para ser evitado en el mapeo de cromosomas. Este escollo es revelado por un cuidadoso exámen de la relación entre recombinaciones y entrecruzas, las cuales aunque cercanamente relacionadas no son la misma cosa. Hay que aclarar que recombinación son nuevas combinaciones de genes ligados y entrecruzamiento, como proceso que produce recombinación, es el intercambio de segmentos correspondientes entre cromátidas de cromosomas homólogos. Los datos de la cruce de prueba, al mismo tiempo que dan la frecuencia de recombinación, provee una medida de frecuencia de entrecruzamiento.

Por otra parte si dos genes A y B están alejados en su cromosoma, dos intercambios entre un par de cromátidas tendría el efecto de la Figura 1. Este doble cruzamiento entre dos cromátidas es genéticamente detectable ya que se produce el mismo tipo de cromátida del parental.

El doble crossing over no es usualmente frecuente con distancias por debajo de cinco unidades de mapeo o para ciertos cromosomas con distancias superiores a 15 o 20 unidades de mapeo. Los datos para mapeo de cromosomas deben ser tomados por pares de genes ligados que son mantenidos cerca y juntos tanto, que los valores de recombinación proveen una medida de ocurrencia de entrecruzamiento.

Los genetistas han encontrado que un camino eficiente para obtener los datos de recombinación es emplear la prueba de cruzamiento de tres puntos que envuelven tres diferentes genes situados en un relativamente corto segmento de cromosoma. Una de las ventajas de la prueba de cruzamiento de tres puntos puede ser vista en la Figura 1 comparándola con la Figura 2,

qué pasaría si entre los genes A y B de esta figura, un tercer gen C estuviera segregando?. Entonces el doble crossing over entre A y B podría ser

detectado genéticamente por la alteración de relación del alelo del medio como se muestra en la Figura 2.

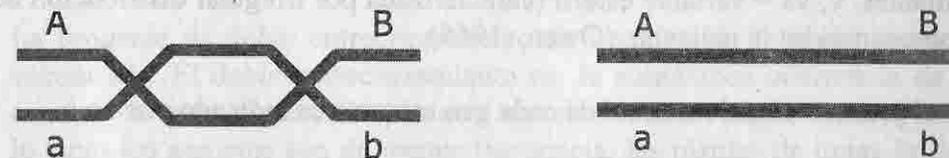


FIGURA 1. Si únicamente dos pares de alelos en el mismo cromosoma están disponibles como marcadores, un doble cruzamiento entre las dos cromátidas no es generalmente detectable, ya que los genes combinados producen las mismas cromátidas del material parental.

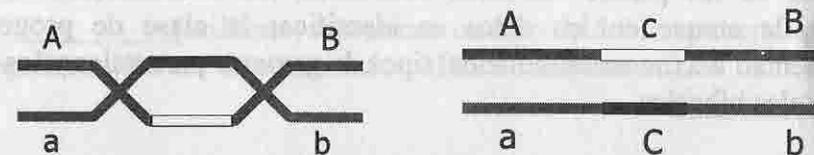


FIGURA 2. Doble entrecruzamiento entre dos pares alélicos es genéticamente detectable si un tercer par de alelos está ubicado en el segmento intercambio, bajo tales circunstancias, las cromátidas con nueva combinación genética son producidas.

Una prueba de cruce de tres puntos en maíz

Ahora, iniciando con los datos experimentales mostrados en la Tabla 1, podemos aplicar algunos de estos principios en un problema específico de mapeo de genes en un cromosoma.

Los datos son de cruces de pruebas de estudios realizados por G.W. Beadle y envuelve la segregación de tres mutantes recesivos de maíz, éstos son: v = plántulas virescentes (verde amarillentas); gl = plántulas con hojas brillantes, y, va = variable estéril (caracterizada por irregular distribución de cromosomas en la meiosis) (Owen, 1965).

En el proceso el alelo normal de cada gen mutante es indicado por un +.

Los datos de Beadle en el cruce de prueba son mostrados en la columna I y II de la Tabla 1. La columna III será referida en detalle más tarde, pero su significado debe ser evidente.

Clones de parental y doble entrecruzamiento

En el análisis de la progenie de un cruce de prueba de tres puntos, es bueno obtener de los puntos extremos conocidos, los desconocidos. Un punto obvio de ataque en los datos es identificar la clase de progenie que representan los (no recombinados) tipos de gametos parentales y los tipos en parentales híbridos.

Estos parentales en el cruce considerado fueron los genotipos $\frac{+}{gl} \frac{+}{va} \frac{+}{v}$

teniendo todos los dominantes en un cromosoma y todos los recesivos en su homólogo. Por lo tanto la progenie normal (+ + +) y los individuos que tienen virescentes brillantes y esterilidad variable, son los dos clones que representa el tipo de gameto parental entre los segregantes de la cruce de prueba.

Al observar la Tabla 1 se nota que estos tipos de gametos incluyen el mayor número de individuos. Entonces se desconoce el tipo de genes que tienen los parentales, éstos pueden deducirse sobre la base de la frecuencia relativa de la clase de gametos que en nuestro caso corresponde a: + + + y $\frac{gl}{va} \frac{v}{v}$

Es necesario aclarar que hasta el momento nuestra representación de la secuencia de genes en el parental es puramente arbitraria y puede no representar el verdadero orden de los genes.

La progenie de doble entrecruzamiento de intercambio también puede ser encontrada. El doble entrecruzamiento es la simultánea ocurrencia de dos eventos de entrecruzamiento, lo cual es relativamente menos probable. Por lo tanto los gametos son de menor frecuencia, las plantas de hojas brillante representadas únicamente siete veces y virescentes con esterilidad variable de las cuales únicamente hay cuatro, son claramente la progenie del doble entrecruzamiento.

Se puede observar que cuando un miembro que procede de doble entrecruzamiento es identificado, los otros miembros pueden inmediatamente ser reconocidos.

Si $\frac{gl}{+} \frac{+}{+}$ (brillante) represente un tipo de doble entrecruzamiento, su compañero debe ser de constitución alélica complementaria

$\frac{+}{va} \frac{+}{+}$

Determinación del orden de los genes

Una vez los parentales y los gametos de dobles entrecruzamientos son establecidos. El razonamiento aquí está basado en la consecuencia del doble entrecruzamiento mostrado en la Figura 2 que indica que en su efecto está en el cambio de los miembros del par de alelos central.

Por lo tanto, se observa en los datos del cruce de prueba de tres puntos cual es el paro de alelos que es traspuesto para hacer el doble entrecruzamiento dentro de los parentales, aquel para alélico debe estar situado entre otros dos. Para fácil observación se puede escribir otra vez los parentales y los tipos de doble entrecruzamiento indicados en el estudio de ligamiento de maíz.

Tipos de parental	Gameto de doble entrecruzamiento
$\begin{array}{ccc} + & + & + \\ \hline gl & va & v \end{array}$	$\begin{array}{ccc} gl & + & + \\ \hline + & va & v \end{array}$

Aquí se puede observar cuál es el gameto que ha sido traspuesto en el doble entrecruzamiento, por lo tanto en el actual orden lineal de los genes en el cromosoma, gl debe estar situado entre va y v. Los padres heterocigotos pueden ahora ser diseñados correctamente así:

$$\begin{array}{ccc} + & + & + \\ \hline v & gl & va \end{array}$$

Al diagramar el doble entrecruzamiento entre cromátidas del tipo parental escrito en orden correcto, se demuestra que los tipos de gametos derivados corresponden a aquellos indicados por los datos del cruce de prueba (Figura 3).

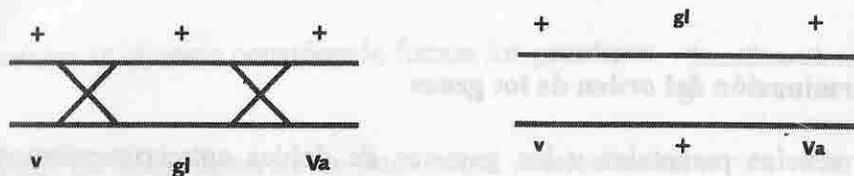


FIGURA 3 Mirando al correcto tipo de híbrido parental mostrado en la Figura 3 a la izquierda, se puede observar que un simple entrecruzamiento del loci de v y gl dan lugar a cromátidas $v + +$ y $+ gl va$

Esta región del cromosoma entre v y gl puede llamarse por conveniencia Región I. También un simple entrecruzamiento entre gl y va da lugar a cromátidas que son :

$$+ + va \text{ y } v gl +$$

Entonces estas cromátidas son el resultado del entrecruzamiento en la Región II.

Ahora se resume los datos del cruce de prueba de tres puntos mostrando la frecuencia gamética de diferente tipo de cromosomas así:

$\begin{array}{ccc} + & + & + \\ \hline v & gl & va \end{array}$	235 270	Tipo parental
$\begin{array}{ccc} + & gl & + \\ \hline v & + & va \end{array}$	7 4	Tipo de doble entrecruzamiento
$\begin{array}{ccc} v & + & + \\ \hline + & gl & va \end{array}$	60 62	Simple entrecruzamiento. Región I
$\begin{array}{ccc} + & + & va \\ \hline v & gl & + \end{array}$	40 48	Simple entrecruzamiento. Región II
Total	726	

Distancia en el mapa

Las distancias en el mapa de cromosomas pueden ser calculadas. Hay que recordar que la frecuencia de entrecruzamiento se puede trasladar directamente a unidades de distancia en el mapa.

El presente ejemplo el entrecruzamiento en la Región I está representado por los gametos siguientes:

v	+	+	60
+	gl	va	62
+	gl	+	7
v	+	va	4
Total			133

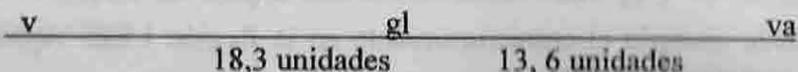
En esta representación se incluyen los datos de todo los entrecruzamientos sucedidos en la Región I que se identifican por ser diferentes a los parentales.

Si la frecuencia gamética mostrada de diferentes tipos de cromosomas fue de 726 y 133 representa el intercambio producido entre el loci v y el gl correspondiendo al 18,3% de 726, entonces la distancia en el mapa entre v y gl es de 18,3 unidades.

De la misma forma se puede establecer la distancia en el mapa entre gl y v. Entonces con los datos de la Tabla 1 se observó cual fue el entrecruzamiento en la Región II, así:

+	+	va	40
v	gl	+	48
+	gl	+	7
v	+	va	4
Total			99

Los casos de entrecruzamiento en la Región II son 90 en 726 cromátidas, es decir, el 13,6%; luego la distancia en el mapa entre gl y va es de 13,6 unidades. El segmento del cromosoma podemos representarlo de la siguiente forma:



Coincidencia e interferencia

Una vez una porción de un mapa de cromosomas esta establecida, ésta provee al genetista valores específicos de probabilidad. La distancia de 18,3 unidades entre v y gl significa que nosotros podemos esperar 18,3% de gametos que representa el entrecruzamiento entre los loci de estos genes, de igual forma sucede con el valor de 13,6 para los genes gl y va.

Si en la porción del cromosoma de maíz que hemos mapeado el entrecruzamiento en la Región I es independiente del entrecruzamiento de la Región II, la probabilidad de cruzamientos simultáneos en las dos regiones puede obtenerse por aplicación del principio que dice que "cuando dos eventos son independientes, la probabilidad de su ocurrencia simultánea es el producto de sus probabilidades simples o separadas" (Owen, 1965).

En otras palabras en nuestro ejemplo si el entrecruzamiento en las dos regiones es independiente $0,183 \times 0,136 = 0,025 = 2,5\%$ de entrecruzamiento debe ser esperado, pero en los datos observados únicamente $\frac{11}{726} = 1,5\%$ de doble entrecruce ocurre.

Esta diferencia entre lo observado y lo esperado se explica si se tiene en cuenta que en la mayor parte de los organismos superiores, la formación de un quiasma reduce en forma efectiva la probabilidad de la formación de otro en una región del cromosoma inmediatamente adyacente. Esta reducción en la formación de quiasma bien puede deberse a una incapacidad física de las cromátidas para doblarse sobre sí mismas hacia otras dentro de cierta distancia mínima. El resultado neto de esta interferencia es la observación de un menor número de entrecruzamientos de intercambio de tipo doble de los que cabría esperar de acuerdo con la distancia del mapeo.

El grado de interferencia varía en los diferentes segmentos del cromosoma y por lo general se expresa con un coeficiente de coincidencia o el índice entre los entrecruzamientos de intercambio dobles observados y los esperados.

El procedimiento puede ser descrito para determinar la localización del gen S en una especie para lo cual la transmisión de n-1 gametos ocurre únicamente a través de huevos. El cromosoma suprimido es llamado "O". El resultado del cruce depende sobre si el dominante (S) o recesivo (s) está en el monosómico.

Para determinar el cromosoma en el cual un alelo dominante está localizado, el monosómico es cruzado como madre, para un genotipo que es el homocigoto para el alelo recesivo controlado este carácter, si el gen no está localizado en el cromosoma alterado en el monosómico, las plantas F1 tendrán todas el fenotipo dominante.

Si el gen está en el cromosoma alterado, se observa segregación para el factor recesivo y dominante; en la progenie monosómica se expresan los fenotipos recesivos y los dominantes en la disómica.

Para establecer el cromosoma en el cual un alelo recesivo ocurre, los monosómicos son cruzados como madres con un individuo homocigotico dominante (Tabla 3). La totalidad de la planta F1 tendrán genotipo dominante, si ellos son monosómicos o disómicos. La segregación en los F2 determinará sobre cual cromosoma el gen está localizado. Si el gen no está en el cromosoma extraño la progenie de todas la plantas F1 segregan 3:1. Si el gen está en el cromosoma extraño las plantas monosómicas F1 tendrán fenotipos no recesivos en su progenie F2 (Fehr, 1987).

Mapeo de genes usando el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción

Una de las primeras y más extensivas aplicaciones de las RFLPs en eucariotes es el desarrollo de un detallado mapa de ligamiento. En humanos ésto ha sido productivo. El mapeo RFLPs es ahora un camino eficiente para mapear genes y ha permitido mapear muchos marcadores morfológicos y bioquímicos (Bruening, 1987).

Esta técnica ha sido extendida a una amplia variedad de organismos y teóricamente podría ser aplicada en cualquier organismo. En maíz y tomate

los RFLPs fueron rápidamente utilizados en su ya detallado mapa genético, el cual ha sido desarrollado con base en polimorfismo morfológico.

El análisis de segregación de marcadores RFLPs es facilitado por:

a) codominancia de los alelos; b) el extensivo polimorfismo encontrado; c) el mínimo efecto pleiotrópico de marcadores individuales; d) la ausencia o limitada influencia del ambiente, y, e) la disponibilidad de métodos para análisis de ligamiento.

El número de probes o sondas necesario para saturar un genoma ha sido estimado tanto para alogamas como para autógamias.

Por ejemplo si asumimos un genoma de 1.500 cM, 286 marcadores RFLPs al azar serán necesarios para cubrir el genoma en cada 20 cM.

Para el mapeo genético utilizando marcadores RFLPs se deben seguir los siguientes pasos:

1. Desarrollar fuentes probes o sondas

Se refiere a la conformación de librerías o genotecas. En algunos casos, genes responsables para un carácter de interés han sido ya clonados. Estos clones pueden ser directamente mapeados y su identidad confirmada.

2. Selección de parentales que sean muy diferentes genéticamente

La selección de especies y líneas parentales influyó en la frecuencia con la cual el polimorfismo frecuente fue detectado entre líneas comerciales, sin embargo un nivel alto de polimorfismo fue visto cuando el tomate fue comparado con su pariente silvestre. La selección de padres genéticamente diversos es requerida para un rápido desarrollo de un mapa genético. (Bruening, 1987)

3. Efectuar el cruce bajo condiciones controladas

Esto con el objeto de garantizar que la progenie obtenida corresponda a los padres que se habían seleccionado.

4. Identificar los probes polimórficos

Se lleva a cabo en las líneas parentales.

5. Evaluación de la población segregante

Para ello es importante que la población segregante tenga un adecuado número de individuos. Los análisis de segregación son hechos preferiblemente en poblaciones F2 por la gran cantidad de información contenida por individuo, cruces de prueba y retrocruzamiento pueden ser usados en casos específicos.

La evaluación de la población segregante se hace con el mayor número de marcadores RFLPs que hayan mostrado polimorfismo entre los parentales seleccionados. Cuanto mayor número de marcadores RFLPs se usen más saturado será el mapa que se obtenga. (Ramírez, 1991).

6. Establecer ligamiento entre marcadores

El ligamiento de cada marcador con cada uno de los demás se hace basándose en la prueba de máxima probabilidad y el LOD SCORE. Esto se realiza a través de un programa de computador llamado MAPMAKER. El LOD SCORE se basa en la frecuencia de recombinación.

$$\text{LOD SCORE} = \text{Log}_{10} X \frac{\text{Probabilidad de que 2 clones esten ligados}}{\text{Probabilidad de que no lo están}}$$

Cuando LOD SCORE = 3,0 y la frecuencia de recombinación 0,3 hay ligamiento.

7. Establecer grupos de ligamiento

Cuando se evalúan pocos marcadores los grupos de ligamiento superan al número de cromosomas del cultivo, pero cuando el número de grupos de ligamiento es igual al número de cromosomas del cultivo (Ramírez, 1991)

8. Establecer el orden de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento utilizando la prueba de tres puntos, cuatro puntos y n puntos.

9. Establecer la distancia génica (en cM) entre los marcadores de cada grupo. La suma de las distancias génicas dentro de cada grupo de ligamiento nos dará una idea del tamaño del cromosoma o porción cubierta por estos marcadores, y, la suma de las distancias génicas cubiertas por cada grupo de ligamiento nos dará una idea de la distancia cubierta dentro del genoma del cultivo.

10. Ubicación de grupos de ligamiento en cromosomas específicos

Los mapas genéticos desarrollados con marcadores RFLPs pueden ser ubicados en cromosomas específicos, usando: 1) marcadores con ligamiento ya asignados a cromosomas específicos; 2) en maíz monosómicos y cromosoma con translocación B - A; 3) en trigo, tomate y algunas otras especies se usan aneuploides (Bruening, 1987).

Correlación de características agroeconómicas con marcadores de RFLPs (Gene Tagging)

Existe un buen número de características monogénicas como la androesterilidad genética, los genes restauradores, resistencia a enfermedades, etc., las cuales se comportan de una manera dominante o recesiva. La transferencia de estas características requiere de mucho tiempo de trabajo y algunas veces los mejoradores tienen que recurrir a complicados esquemas de mejoramiento.

Si tales características se pudieran ligar estrechamente con marcadores moleculares o de RFLPs, el tiempo y costo de la detección y transferencia

de dichas características sería reducido drásticamente, debido a que la presencia o ausencia del marcador en un estadio bien temprano indicaría la presencia o ausencia del gen que codifica por la característica de interés en un estado bien temprano del desarrollo de la planta mucho antes de que la característica se exprese (Ramírez, 1991).

Para ligar un gen que codifica por alguna característica de interés con algún marcador de RFLPs se requiere un ligamiento bien estrecho (menos de 5 cM), porque si la ligación no es tan estrecha, los niveles de recombinación podrían ser tan altos que se podría perder la oportunidad de evaluar la característica a través de este marcador.

Este problema puede ser evitado ligando más de un marcador alrededor del gen de interés como por ejemplo marcadores que delimiten el gen (Flanking markers), y de esta forma se aumenta la probabilidad de detectar la característica evaluando simultáneamente los marcadores que la delimitan.

La Tabla 4 muestra algunos ejemplos de marcadores protéicos e isoenzimáticos correlacionados con características agroeconómicas.

La incorporación de genes de resistencia a enfermedades a variedades susceptibles se hace a través de cruces con stocks que poseen el gen (s) de resistencia, seguidamente se hace una selección de progenie a través de inoculaciones con el patógeno. Todo este tipo de trabajo puede ser evitado detectando el ligamiento de genes de resistencia con marcadores de RFLPs con los que podría hacer una rápida selección de la progenie inclusive para la resistencia a varias enfermedades simultáneamente usando los marcadores de RFLPs apropiados.

Tabla 1. Un cruce de prueba de tres puntos de maíz.

I Fenotipos de la progenie del cruce de prueba	II Número de individuos	III Genotipos de los gametos		
Normal	235	+	+	+
H. brillante esterilidad variable	62	gl	va	+
Variable estéril	40	+	va	+
Variable estéril virescente	4	+	va	+
Brillante variable estéril virescente	270	gl	va	v
Brillante	7	gl	+	+
Brillante virescente	47	gl	+	v
Virescente	60	+	+	v

Tabla 2. Cruce con monosómicos para localización de alelos dominantes

Possible cruzamiento	F1
Cuando el gen no está en el cromosoma suprimido	SS x ss Ss dominante
Cuando el gen está en el cromosoma suprimido	SO x ss Ss dominantes sO recesivo

Tabla 3. Cruzamientos con monosómicos para determinar a localización de un alelo recesivo.

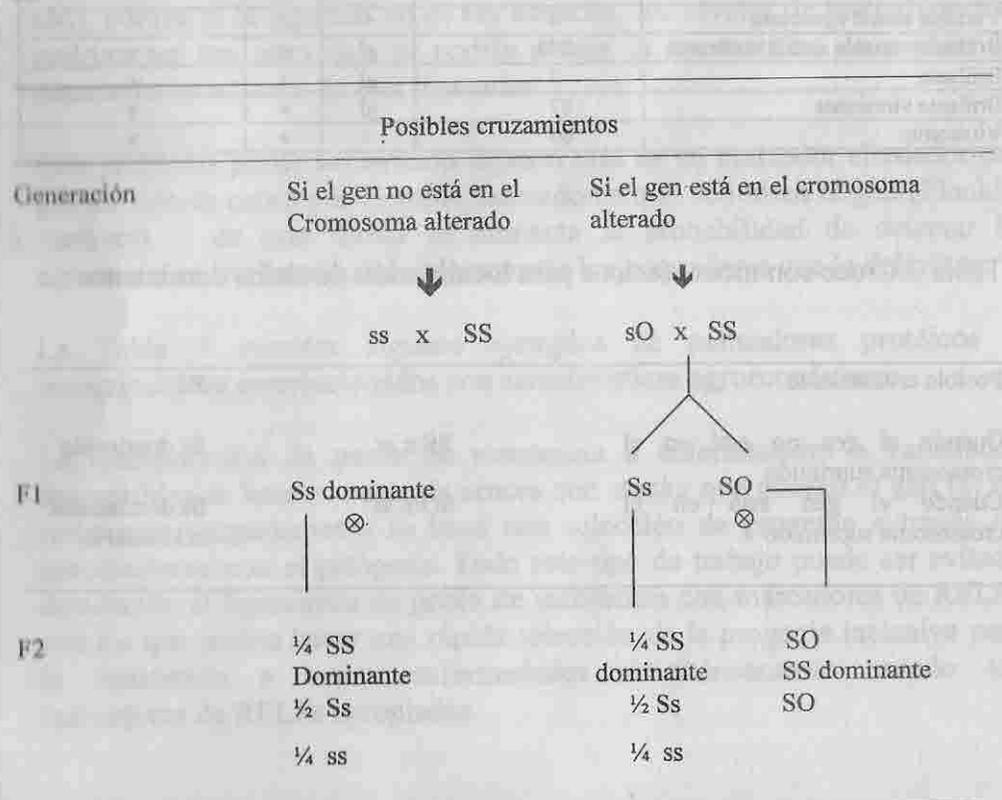


Tabla 4. Algunos marcadores protéicos e izoenzimáticos ligados a características de interés

Cultivo	Marcador	Característica	Referencia
Tomate	Acp-1	Referencia a nemátodos	Rick and Fobes 1974
Tomate	Got-2	Resistencia a raza 3 de Fusarium	Bournival et al 1989
Tomate	Prx-2	Macho esterilidad	Tanksley et al 1984
Arveja	Pgm	Resistencia a virus del mosaico amarillo del frijol	Weeden et al 1984
Fríjol	Adh-1, Got-2	QTL (SsZ-1) tamaño de la semilla	Vallejos, 1990
Fríjol	Arcelina	Resistencia al brúquido zabrotes sub-fasciatus	Osborn et al 1986.
Fríjol	Faseolina	Marcador evolutivo	Gepts, 1988

BIBLIOGRAFÍA

BRUENING, G. HARADA KOSUNGE, T. Y HOLLAENDER, A. Tailoring genes for crop improvement. And Agricultural Perspective Plenum Press. New York, 1987.

CALDERÓN, A. Marcadores moleculares. La Nueva biotecnología fundamentos usos y perspectivas. Palmira, ICA, 1990. 261 p.

FEHR, W.R. Principles of cultivar development. MacMillan Publishin Company New York. 1987.

RAMÍREZ, H. LOS RFLPS y su utilización en el mejoramiento vegetal. Seminario Post-Grado Producción Vegetal. Palmira, 1991.56 p.

SRB, A, OWEN, R., EDGAR, R. General genetics. H.W. Freeman and Company San Francisco. 1965.

STANFIELD, W.D. Genética, teoría y problemas. Interamericana. México, McGraw Hil, 1990.