

ANÁLISIS DE INTEGRIDAD GENÉTICA EN EMBRIONES SOMÁTICOS Y CRIOCONSERVADOS DE *Agave tequilana* Weber Var. Azul MEDIANTE MARCADORES AFLP

GENETIC INTEGRITY ANALYSIS IN SOMATIC AND CRYOPRESERVED EMBRYOS OF *Agave tequilana* Weber Var. Azul USING AFLP MARKERS

Delgado-Aceves, L.*; Portillo, L.

Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, C.P. 45110, México. *E-mail: lourdes.delgado@alumnos.udg.mx

Fecha de envío: 20, mayo, 2025

Fecha de publicación: 20, julio, 2025

Resumen:

La embriogénesis somática es una estrategia utilizada en *Agave tequilana* para su propagación y conservación. Sin embargo, procesos como la regeneración *in vitro* y la crioconservación pueden inducir variaciones somaclonales, comprometiendo la integridad genética del germoplasma. El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad genética de embriones somáticos y embriones post-crioconservados mediante marcadores AFLP. Se obtuvieron muestras de ADN de plantas madre, embriones somáticos germinados y embriones post-crioconservados, las cuales se analizaron cinco combinaciones de cebadores AFLP. Los resultados mostraron un porcentaje de loci polimórficos de 42% en plantas madre, 38.8% en embriones germinados y 47.2% en embriones crioconservados. La mayor distancia genética se observó en los individuos regenerados, sugiriendo que la variación está más asociada a la embriogénesis que al proceso de crioconservación. El análisis permitió evidenciar polimorfismos entre individuos, confirmando la utilidad de esta herramienta para la detección de variación genética en sistemas de cultivo *in vitro*.

Palabras clave: embriogénesis somática, crioconservación, variación somaclonal, maguey tequilero.

Abstract:

Somatic embryogenesis is a strategy used in *Agave tequilana* for propagation and conservation. However, *in vitro* regeneration and cryopreservation processes may induce somaclonal variations, compromising the genetic integrity of the germplasm. This study aimed to assess the genetic stability of somatic embryos and post-cryopreserved embryos using AFLP markers. DNA samples from mother plants, germinated somatic embryos, and post-cryopreserved embryos were obtained and analyzed using five AFLP primer combinations. Results showed polymorphic loci percentages of 42% in mother plants, 38.8% in germinated embryos, and 47.2% in cryopreserved embryos. The highest genetic distance was observed in regenerated individuals, suggesting that variation is more related to somatic embryogenesis than cryopreservation. Analysis allowed detection of polymorphisms among individuals, confirming its usefulness for identifying genetic variation in *in vitro* culture systems of *Agave tequilana*.

Keywords: somatic embryogenesis, cryobiotechnology, somaclonal variation, maguey tequilero.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares son herramientas eficaces para detectar cambios en el genoma, basados en diferencias en secuencias cortas de ADN entre individuos, las cuales pueden manifestarse como rasgos dominantes o codominantes (Karp et al., 1997; Karp & Edwards, 1998). Su aplicación representa una ventaja significativa sobre otros métodos como la evaluación fenotípica, especialmente en especies donde los cambios fenotípicos no son evidentes (Rahman & Rajora, 2001).

Estos marcadores pueden clasificarse en tres categorías: los que no dependen de PCR, los que usan iniciadores arbitrarios o semiarbitrarios (como MAAP), y los que utilizan sitios específicos como los ISSR, estos dos últimos basados en PCR (Azofeifa-Delgado, 2006). Dentro de esta gama, los ISSR (Zietkiewikz et al., 1994), RAPD (Williams et al., 1990; Rani et al., 1995; Gil-Vega et al., 2001) y AFLP (Infante et al., 2003; Gil-Vega et al., 2006) son los más utilizados. Particularmente, los AFLP, por su capacidad de detectar múltiples loci simultáneamente, resultan adecuados para revelar variaciones en regiones genómicas desconocidas (Vos et al., 1995).

En el caso de *Agave* spp., los estudios moleculares han permitido identificar diferencias genéticas entre especies e individuos. Marcadores ISSR han demostrado ser útiles para establecer relaciones genéticas y evaluar variabilidad en especies tropicales del género (Dávila et al., 2007; Torres-Morán et al., 2013). Los AFLP han destacado por su robustez, reproducibilidad y porque no requieren conocimiento previo del genoma (Keb-Llanes et al., 2012; Ayil-Gutiérrez et al., 2025), permitiendo detectar variaciones entre plantas madre y clones (Infante et al., 2006).

Las plantas regeneradas a partir de cultivos celulares pueden presentar cambios genéticos y epigenéticos, conocidos como variación somaclonal (Bhojwani & Dantu, 2013; Portillo et al., 2007). Factores como los reguladores de crecimiento, tipo y tamaño del explante, medio de cultivo, genotipo, condiciones ambientales, nutrientes y antioxidantes, influyen en su aparición (Ayala, 2010; Viñas & Jiménez, 2011; Portillo et al., 2012). Las variaciones pueden ser genéticas (como rearrreglos cromosómicos, entrecruzamiento somático, metilación del ADN, alteraciones en replicación o silenciamiento génico) o epigenéticas, detectadas mediante análisis de ADN o pruebas de herencia (Tabares et al., 1991).

En lo referente a la conservación, múltiples estudios han mostrado que las muestras crioconservadas mantienen su estabilidad genética. Técnicas morfológicas, citológicas, bioquímicas y moleculares confirman que el almacenamiento en nitrógeno líquido con regeneración directa desde tejidos organizados minimiza las mutaciones, a diferencia de procesos prolongados de cultivo *in vitro* (Harding, 2004; Reed, 2008).

Con base en lo anterior, este trabajo tiene como objetivo analizar la variación genética en embriones somáticos y embriones post-crioconservados de *A. tequilana* mediante marcadores AFLP, comparando los perfiles con los de las plantas madre. El estudio pretende aportar evidencia sobre la estabilidad genética de materiales regenerados y evaluar el posible impacto del proceso de crioconservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), INIFAP. Se empleó material vegetal del genotipo ES4 de *Agave tequilana* Weber var. azul, incluyendo plantas madre (PM), embriones somáticos germinados (PIV) y embriones post-crioconservados (PIC).

Se seleccionaron y procesaron un total de 36 plantas madre (PM), 18 embriones somáticos germinados (PIV) y 15 embriones post-crioconservados (PIC). La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de tejido fresco, utilizando el protocolo de Saghai-Marroof et al. (1984), adaptado con modificaciones específicas para *Agave*. Las muestras fueron congeladas a -80 °C durante 24 h, posteriormente se molieron con nitrógeno líquido y se sometieron a extracción con cloroformo:octanol (24:1), tratamiento con RNAsa y precipitación con isopropanol. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y su concentración fue determinada mediante espectrofotometría UV (NanoDrop 2000).

El análisis de marcadores (AFLP), se realizó con una digestión enzimática con EcoRI y MseI, seguida de la ligación de adaptadores específicos. Posteriormente, se llevó a cabo una preamplificación y amplificación selectiva utilizando cinco combinaciones de cebadores (por ejemplo, EcoRI+ACA/MseI+CAG). Los productos fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y visualizados mediante tinción con nitrato de plata. Para la construcción de la matriz binaria (presencia (1) y

ausencia (0) de bandas) se consideraron únicamente las bandas con un tamaño entre 80 y 500 pb, criterio establecido por su reproducibilidad y claridad en la visualización. Se excluyeron bandas débiles o ambiguas. El número total de loci generados por cada combinación de cebadores se registró, al igual que el número de loci polimórficos por combinación. La matriz fue analizada con el software NTSYSpc 2.0 utilizando el coeficiente de similitud de Nei (1973) y el método de agrupamiento UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de extracción por Saghai-Marroof et al. (1984) con modificaciones, resultó efectivo y aplicable para *Agave tequilana*, ya que se obtuvo ADN de alta calidad y rendimiento (50 ng/ μ L). La cuantificación se llevó a cabo por la lectura de espectrofotometría UV, empleando la relación de 260/280 OD (densidad óptica). Además, se realizó una valoración electroforética comparado con las concentraciones conocidas de ADN del fago lambda indicando un ADN de calidad e integridad de acuerdo con los patrones de migración de las muestras. De las cinco combinaciones empleadas en el presente estudio, la combinación *EcoR* I ACA+ *Mse*I GAGA fue la única donde no se detectaron polimorfismos. En comparación, la combinación *EcoR* I AGG+ *Mse*I CAAG presentó el polimorfismo más alto de 54 %. Se obtuvieron un total de 69 loci, a través de los tres grupos de muestras: plantas madre (PM), embriones somáticos (PIV) y embriones somáticos post-crioconservados (PIC) de los cuales 25 fueron polimórficos, es decir, un 17.5 %. Con respecto a los porcentajes de loci polimórficos por grupo presentaron 42 % (PM), 38.8 % (PIV) y 47.2 % (PIC) respectivamente (Cuadro 1).

Con base en la matriz binaria realizada por presencia/ausencia de las bandas, donde para fines de este estudio solamente se consideraron los fragmentos dentro del rango 500 a 80 pb, se construyeron árboles por cada grupo de muestras: plantas madre (PM; Figura 1) embriones somáticos (PIV; Figura 2) y embriones crioconservados (PIC; Figura 3).

Cuadro 1. Porcentaje de loci polimórficos por grupo de muestra en *Agave tequilana* Weber var. azul.

Table 1. Percentage of polymorphic loci by sample group in *Agave tequilana* Weber var. azul.

Grupo	Número de muestras	Loci polimórficos	% Polimorfismo
Plantas madre (PM)	36	28	42.0 %
Embriones somáticos germinados (PIV)	18	26	38.8 %
Embriones post-crioconservados (PIC)	15	32	47.2 %
Total de loci analizados	69		

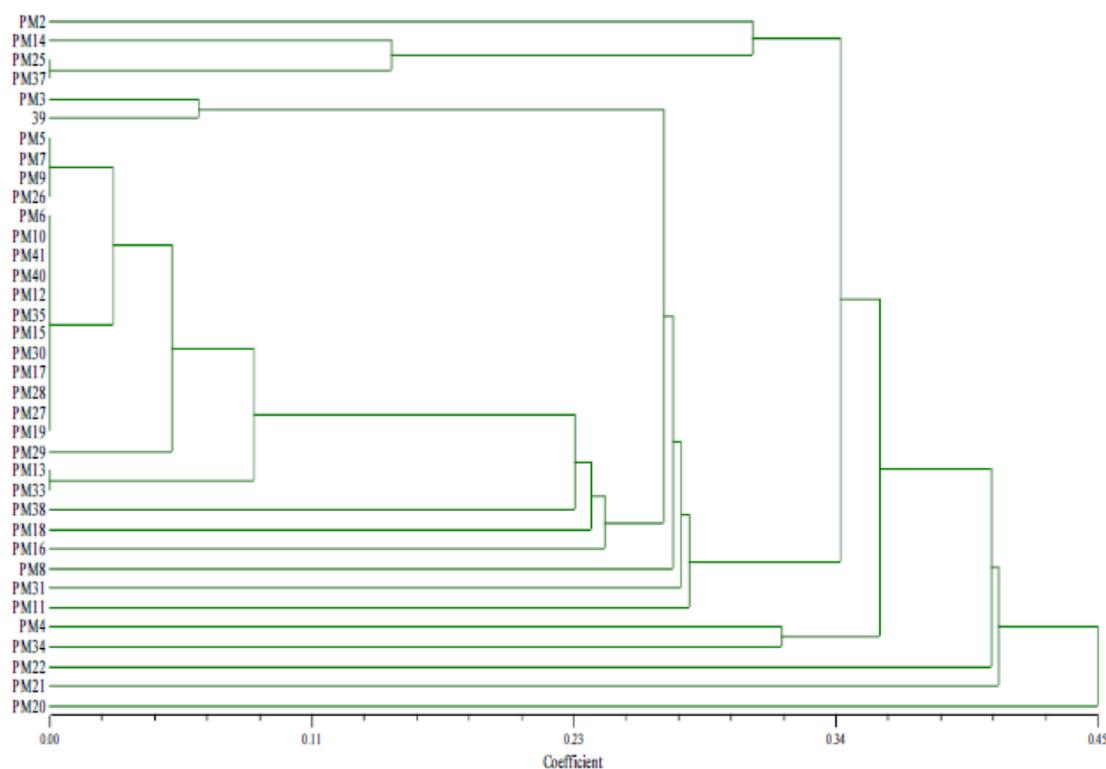


Figura 1. Dendrograma generado para la población de plantas madre (PM), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Figure 1. Dendrogram generated for the population of mother plants (MP) based on similarity coefficient by Nei (1973) and UPGMA clustering

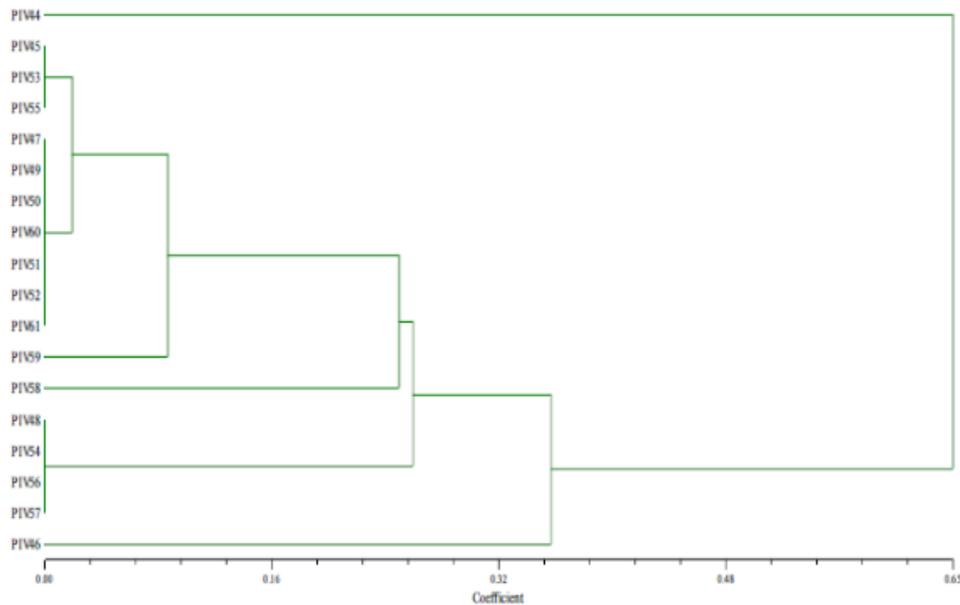


Figura 2. Dendrograma generado para la población de embriones somáticos germinados (PIV), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Figure 2. Dendrogram generated for the population of germinated somatic embryos (GSE) based on similarity coefficient by Nei (1973) and UPGMA clustering.

Contrastando los árboles generados para cada grupo de muestras; PM (Figura 1), PIV (Figura 2) y PIC (Figura 3) se puede observar que existe una mayor distancia genética en los individuos PIV (0.65) en comparación con las PM (0.45) a pesar de que se analizaron un mayor número de individuos en este último grupo. Sin embargo, se obtuvieron coeficientes muy cercanos entre los grupos de muestras PM (0.45) y PIC (0.46), este hecho nos demuestra que la distancia genética entre los individuos está dentro de un rango no mayor al generado por PIV del 0.65 para el total de individuos analizados.

Portillo (2007), utilizando marcadores ISTR en agave, reportó un 60% de polimorfismo en embriones somáticos, lo que sugiere que la variación somaclonal es común en este género y que el material regenerado no puede considerarse clonal. Aunque el polimorfismo en *Agave* es alto, es menor en comparación con otras especies comerciales, donde se han reportado niveles de hasta 95% (Medina et al., 2007).

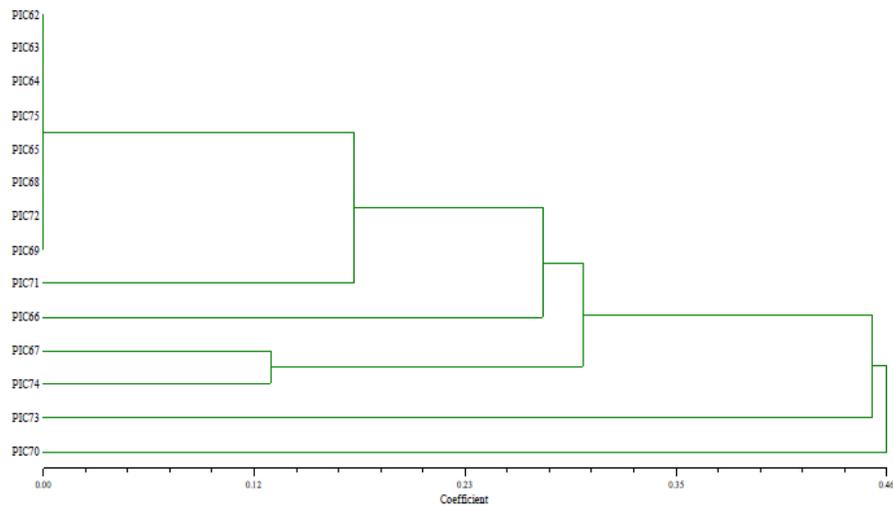


Figura 3. Dendrograma generado para la población de embriones somáticos post-crioconservados (PIC) basado en el coeficiente de similitud de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Figure 3. Dendrogram generated for the population of post-cryopreserved somatic embryos (PCE) based on similarity coefficient by Nei (1973) and UPGMA clustering.

En particular, los individuos que pertenecen a los grupos PIV y PIC, presentan un valor de variación cercano a los de PM. Esto se puede atribuir a los procesos de regeneración por embriogénesis somática indirecta y condiciones *in vitro* por el cual, los tres tipos de materiales han experimentado. Cabe señalar que las muestras de las PM también fueron obtenidas por embriogénesis somática.

Por lo anterior, considerando solamente los niveles de polimorfismo del grupo PIC el cual presentó mayor valor nos indica que posiblemente hubo cambios epigenéticos en la metilación del ADN que se dieron durante el proceso de crioconservación (Hao et al., 2002; Johnston et al., 2009). A pesar de lo observado, es recomendable realizar un muestreo con mayor número de individuos con el fin de detectar diferencias considerables entre las plantas madre y embriones somáticos post-crioconservados. Los análisis que se han aplicado para corroborar la estabilidad genética de los materiales conservados a largo plazo incluyen el uso de marcadores moleculares tales como AFLP y MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) (Hao et al., 2002; Maki et al., 2015), morfológicos (Matsumoto et al., 2013) bioquímicos (Dixit-Sharma, 2005) y

citológicos (San José et al., 2015). En su mayoría, no se han detectado diferencias significativas en el material genético tratado por crioconservación.

La figura 4 representa el dendrograma obtenido con el total de individuos estudiados, cuyo resultado indica que existe una distancia genética mayor de los individuos PIC 70, 73 y 74 y una máxima del 0.54 por los individuos PIC 71 y PIV 44 con respecto a las plantas madre, esto sugiere que las frecuencias alélicas entre los individuos no son iguales.

Por otro lado, cabe señalar que los perfiles generados para la mayoría de los embriones se agrupan entre sí alejándose de las plantas madre, además se observa una agrupación de similitud mayor entre los individuos PM con respecto a los demás grupos, lo cual sugiere la existencia de factores que dan origen a la variación somaclonal a través del proceso de embriogénesis somática.

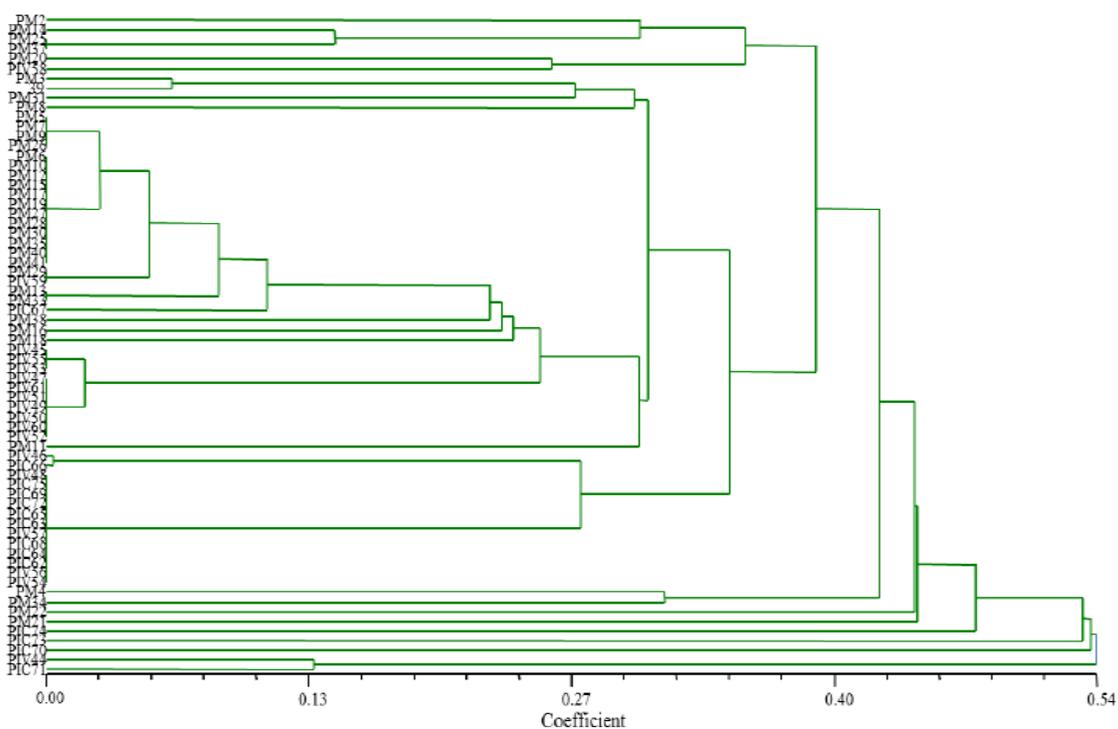


Figura 4. Dendrograma generado a partir de cuatro combinaciones de cebadores para 68 muestras del genotipo ES4. Plantas madre (PM), embriones somáticos (PIV) y embriones somáticos post-crioconservados (PIC), basado en el coeficiente de similitud de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Figure 4. Dendrogram generated using four primer combinations for 68 samples of genotype ES4, including mother plants (MP), germinated somatic embryos (GSE), and post-cryopreserved somatic embryos (PCE), based on similarity coefficient by Nei (1973) and UPGMA clustering.

Si durante el proceso de embriogénesis somática no se generara ningún tipo de cambio genético, se esperaría que los perfiles de los AFLP's de los embriones obtenidos por embriogénesis somática indirecta fueran idénticos o al menos, el patrón de bandeo muy similar. Si este fuera el caso, los materiales deberían agruparse con las plantas madre o a una distancia genética mínima, lo que nos llevaría a plantear que no existe variación somaclonal.

Considerando que existen diferencias significativas entre árboles de una misma población, es importante establecer parámetros que detecten la fidelidad genética de los embriones somáticos o a los menos niveles de uniformidad aptas para el manejo de la especie ya sea en campo o a nivel laboratorio.

Finalmente, es importante señalar que los dendrogramas generados mediante el método UPGMA permitieron evidenciar patrones de agrupamiento entre las muestras analizadas. Sin embargo, cabe destacar que este análisis se realizó con un número limitado de muestras por grupo, lo cual obedeció a la disponibilidad de material biológico, particularmente en el caso de los embriones post-crioconservados, cuya obtención y regeneración implicaron un proceso técnico demandante. Asimismo, al tratarse de un estudio exploratorio, no se contemplaron replicaciones técnicas del análisis molecular. A pesar de estas consideraciones, los resultados obtenidos aportan evidencia preliminar sobre la variación genética entre los grupos evaluados. La aplicación de marcadores AFLP resultó adecuada para detectar polimorfismos en este contexto, confirmando su utilidad como herramienta en estudios donde se busca evaluar de manera inicial la fidelidad genética de materiales regenerados. Además, los resultados respaldan el potencial de la crioconservación como estrategia viable de resguardo del germoplasma, sugiriendo que su implementación puede mantenerse sin comprometer, en principio, la integridad genética de los embriones conservados.



CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra que tanto los procesos de embriogénesis somática como la crioconservación pueden inducir variaciones genéticas en *Agave tequilana* Weber var. azul, aunque la embriogénesis tiene un mayor impacto en la variación observada. Los niveles de polimorfismo detectados mediante marcadores AFLP evidencian la necesidad de realizar monitoreos genéticos continuos en materiales regenerados *in vitro*, especialmente en programas de conservación y producción masiva. La metodología empleada permite una evaluación efectiva de la integridad genética, siendo una herramienta útil para garantizar la fidelidad clonal en estrategias biotecnológicas de conservación de germoplasma.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con el respaldo institucional del Centro Nacional de Recursos Genéticos (INIFAP) y la Universidad de Guadalajara. Los autores expresan su reconocimiento al personal técnico por su asistencia y compromiso durante la ejecución del experimento. Este estudio se dedica respetuosamente a la memoria del Dr. Moisés Cortes Cruz, cuya contribución científica y legado intelectual continúan siendo una referencia en el campo.

LITERATURA CITADA

- Ayala, L. M. (2010). *Inducción de embriogénesis somática en cultivo in vitro de Agave atrovirens Karw. Dyck* (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional.
- Ayil-Gutiérrez, B. A., Sánchez-Teyer, L. F., Rodríguez-Zapata, L. C., Barredo-Pool, F., Ramos-García, V. H., Acosta-Cruz, E., Rodríguez-de la Garza, J. A., Sosa-Santillán, G. de J., Córdova-Quiroz, A. V., Tamayo-Ordoñez, F. A., et al. (2025). Differential physiological changes in stomata in polyploid *Agave* spp. could indicate flexibility in CO₂ fixation. *Agronomy*, 15, 817.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Marcadores moleculares y su aplicación en plantas. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 151–162.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: An introductory text*. Springer Science & Business Media.
- Dávila, J. R., Gil-Vega, K., Rodríguez-Garay, B., Simpson, J., & González, V. (2007). Genetic variation in *Agave tequilana* Weber var. azul detected by AFLP markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(3), 225–236.

- Dixit-Sharma, S., Ahuja-Ghosh, S., Mandel, B. B., & Srivastava, P. S. (2005). Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea*, an endangered medicinal plant. *Scientia Horticulturae*, 105(4), 513–517.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., & Simpson, J. (2006). AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*, 170(5), 904–909.
- Gil-Vega, K., Martínez-Palacios, A., Guzmán-Mendoza, R., Simpson, J., & Vargas-Ponce, O. (2001). AFLP analysis of genetic structure in wild and domesticated populations of *Agave tequilana* Weber. *Genetica*, 111(1–3), 345–351.
- Hao, Y. J., You, C. X., & Deng, X. X. (2002). Analysis of ploidy and the detection of somaclonal variation in citrus callus-derived plants using chromosome counting and RAPD. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(2), 99–106.
- Harding, K. (2004). Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters*, 25(1), 3–22.
- Infante, D., González, G., Peraza-Echeverría, L., & Keb-Llanes, M. (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*, 164(2), 223–230.
- Johnston, J. W., Harding, K., & Benson, E. E. (2009). Antioxidant status and genotypic tolerance of recalcitrant *Ribes* species to cryopreservation. *Plant Science*, 177(6), 565–571.
- Karp, A., & Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In G. Caetano-Anollés & P. M. Gresshoff (Eds.), *DNA markers: protocols, applications and overviews* (pp. 1–13). New York: Gresshoff.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W., & Hodgkin, T. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. Rome, Italy: IPGRI.
- Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2012). A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plant. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 299a–299e.
- Maki, M., Nishino, M., & Ueno, S. (2015). Genetic effects of seed cryopreservation on endangered plants. *CryoLetters*, 36(1), 13–22.
- Matsumoto, T., Akihiro, T., Maki, S., Mochida, K., Kitagawa, M., Tanaka, D., Yamamoto, S., & Niino, T. (2013). Genetic stability assessment of Wasabi plants regenerated from long-term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis. *CryoLetters*, 34(4), 299–304.
- Medina, J. A., García, M., & Rodríguez, A. (2007). Evaluación de la variación genética mediante AFLP en cultivares de *Saccharum officinarum* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 45–54.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321–3323.

- Portillo, L., & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2007). Evaluación de variabilidad somaclonal en *Agave tequilana* regenerado vía embriogénesis somática. *Zonas Áridas*, 11, 1–10.
- Portillo, L., Olmedilla, A., & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2012). Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. *Protoplasma*, 249(4), 1101–1107.
- Rahman, M., & Rajora, O. (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports*, 20(6), 531–536.
- Rani, V., Parida, A., & Raina, S. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports*, 14(8), 459–462.
- Reed, B. M. (2008). *Plant cryopreservation: A practical guide*. Springer Science.
- Saghai-Marouf, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81(24), 8014–8019.
- San José, M., Correidora, E., Oliveira, H., & Santos, C. (2015). Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(3), 489–499.
- Tabares, E., Pachón, J., & Roca, W. M. (1991). Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In *Cultivo de tejidos en la agricultura* (pp. 340–356). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Torres-Morán, M. I., García-Mendoza, A. J., & Aguirre-Planter, E. (2013). Diversidad genética de *Agave cupreata* en el estado de Guerrero, México. *Botanical Sciences*, 91(2), 279–288.
- Viñas, M., & Jiménez, V. M. (2011). Factores que influyen en la variación somaclonal. *Biotecnología Vegetal*, 11(3), 151–160.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183.

