

## Diversidad genética en maíz (*Zea mays* L.) procedente de Pinar del Río y Guantánamo, Cuba, mediante el empleo de RAPD

### Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) from Pinar del Río and Guantánamo by using of RAPD

Yailen Arias Vargas<sup>1✉</sup>, Ivonne González Marquetti<sup>1</sup>, Ileana Miranda Cabrera<sup>1</sup>, Lianne Fernández Granda<sup>2</sup>, Belkis Peteira Delgado-Oramas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), Calles 1 y 2, No. 17200, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

**RESUMEN:** Mediante el uso de marcadores RAPD se analizó la variabilidad genética entre 32 accesiones de maíz (*Zea mays* L.) colectadas en diferentes regiones de las provincias Pinar del Río y Guantánamo, Cuba y cinco variedades comerciales. El dendrograma resultante del empleo del método de Ward y la distancia de Jaccard mostró la formación de cuatro grupos que guardan relación con la procedencia de las accesiones y con las características fenotípicas del grano; lo anterior se corroboró con un análisis factorial de correspondencia. Este resultado permitió conocer la variabilidad genética en el cultivo del maíz entre las regiones estudiadas, lo que constituye una ventaja para los programas de mejoramiento, la conservación del banco de germoplasmas y el enfrentamiento a plagas y enfermedades.

**Palabras clave:** marcador molecular; PIC; variabilidad genética.

**ABSTRACT:** The genetic variability among 32 maize (*Zea mays* L.) accessions collected in different regions of Pinar del Río and Guantánamo, Cuba, and 5 commercial varieties was analyzed by using RAPD markers. The dendrogram resulting from using Ward's method and Jaccard's distance showed the formation of four groups that are related to the origin of the accessions and the phenotypic characteristics of the grain which was corroborated with a factorial correspondence analysis. This result allowed knowing the genetic variability in the maize crop among the places studied, which is an advantage for breeding programs, the conservation of the germplasm bank, and the management of pests and diseases.

**Key words:** molecular marker; PIC; genetic variability

✉ Autor para correspondencia: Yailen Arias. E-mail: [yailenav@censa.edu.cu](mailto:yailenav@censa.edu.cu)

Recibido: 24/7/2017

Aceptado: 4/4/2018

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es un importante cereal que forma parte de la alimentación básica de muchas personas en todo el mundo (1, 2) y constituye una materia prima básica en las industrias de transformación que producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (3). En Cuba, se cultiva desde la época de los aborígenes y constituye alimento básico en la nutrición humana, en el ganado y en las aves (4).

Los recursos genéticos son la fracción de la biodiversidad compuesta por las especies de valor actual o potencial que contribuyen al desarrollo sostenible, a enriquecer la dieta alimentaria y constituyen la materia prima que permitirá, a la humanidad, hacer frente a desafíos de diferentes estreses como son las plagas, las sequías y los cambios climáticos (5, 6). El cultivo del maíz se estudió ampliamente, especialmente el Caribeño, que se destaca por su rendimiento potencial, buena habilidad combinatoria y resistencia a plagas y enfermedades comunes (7). Recientemente, se estudió la diversidad presente en el cultivo en Cuba utilizando parámetros agromorfológicos y contenido de minerales (4, 8); sin embargo, no hay informes de estudios moleculares.

La evaluación de la diversidad genética dentro y entre poblaciones de plantas se desarrolla, usualmente, mediante el uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los marcadores moleculares son los más ampliamente utilizados y comprenden una gran variedad de marcadores de ADN, entre los que se encuentran los ADN Polimórficos Amplificados al Azar (RAPD) (9). En la actualidad, los RAPD continúan siendo el marcador de elección para la evaluación de la variabilidad genética entre diferentes accesiones de una especie (10).

Disponer de una amplia diversidad genética le permite a las especies responder, adaptarse, resistir o recuperarse de los cambios en su entorno. Además, brinda mayores

probabilidades de éxito a los programas de mejoramiento genético, donde se obtienen variedades resistentes que se emplean en el manejo integrado de plagas.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la variabilidad genética existente en el maíz proveniente de diferentes zonas de Cuba mediante el uso de marcadores RAPD, por su posible utilidad en función de la conservación de la diversidad existente y en programas de mejoramiento para la resistencia a plagas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon 37 accesiones de diversas variedades y características morfológicas, 32 de ellas procedentes de colecciones *in situ* de diferentes regiones de las provincias Pinar del Río y Guantánamo (colectadas en fincas tomando el nombre de la variedad según dato aportado por los productores) y cinco variedades comerciales procedentes de la colección *ex situ* perteneciente al Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). (Tabla 1)

La extracción del ADN se realizó por el método de Dellaporta *et al.* (11) en cinco individuos de cada accesión, a partir de una mezcla de hojas jóvenes frescas recolectadas en plantas sanas y con cuatro semanas de germinadas, las cuales se mantuvieron en condiciones semicontroladas de casa de cristal (humedad relativa de 80-85 %, temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperiodo natural). Los precipitados finales obtenidos se disolvieron en solución amortiguadora TE (50mM Tris, 0.5mM EDTA) y conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ . La concentración de ADN total se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260nm, aplicando la fórmula descrita por Sambrook (12). La calidad se verificó por electroforesis en agarosa al 0,8 % en solución amortiguadora TBE (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA) y tinción con bromuro de etidio (12).

Para el desarrollo de la técnica RAPD se evaluaron todos los cebadores de la serie OPA,

**TABLA 1.** Accesiones de maíz empleadas en el análisis de variabilidad genética. / *Maize accessions used in the analysis of genetic variability.*

<b>Código</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variiedad</b>	<b>Color del grano</b>	<b>Tipo de grano</b>
1	Pinar del Río	Criollo	naranja	cristalino
2	Pinar del Río	Criollo	amarillo-naranja	semicristalino
4	Pinar del Río	Criollo	naranja-rojo	cristalino
5	Pinar del Río	Criollo	amarillo-naranja	semicristalino
6	Pinar del Río	Gibara	amarillo-naranja	dentado
7	Pinar del Río	Morao	jaspeado	dentado
9	Pinar del Río	Criollo	amarillo-naranja	semicristalino
11	Pinar del Río	Enano de México	naranja-rojo	cristalino
12	Pinar del Río	Criollo	naranja	cristalino
13	Pinar del Río	Gibara	amarillo	dentado
16	Pinar del Río	Mexicano	naranja	cristalino
17	Pinar del Río	Criollo	amarillo-naranja	cristalino
18	Pinar del Río	Criollo	amarillo-naranja	semicristalino
24	Guantánamo	Tusón	naranja-rojo	dentado
25	Guantánamo	Cuña	amarillo-naranja	semidentado
28	Guantánamo	Morao	rojo	dentado
31	Guantánamo	Sin Nombre	naranja-rojo	dentado
34	Guantánamo	Cuña	amarillo-naranja	dentado
35	Guantánamo	Criollo	amarillo-naranja	semidentado
36	Guantánamo	Pinto	jaspeado	semidentado
37	Guantánamo	Pollo	amarillo-naranja	semidentado
39	Guantánamo	Morao	rojo	dentado
40	Guantánamo	Yanelys	amarillo-naranja	dentado
42	Guantánamo	Argentino	amarillo-naranja	dentado
44	Guantánamo	Canilla	amarillo	semidentado
45	Guantánamo	Cuña	amarillo-naranja	dentado
47	Guantánamo	Tusa fina	amarillo-naranja	dentado
48	Guantánamo	Tusa gruesa	naranja	dentado
50	Guantánamo	Mexicano	jaspeado	dentado
51	Guantánamo	Morao	rojo	dentado
55	Guantánamo	Cuña	amarillo-naranja	dentado
57	Guantánamo	Rosita blanco	blanco	reventador
58	Col. INIFAT	Rosita INIFAT	amarillo	reventador
59	Col. INIFAT	Gibara	amarillo	dentado
60	Col. INIFAT	Francisco Mejorado	naranja	cristalino
61	Col. INIFAT	Pajimaca	blanco	dulce
62	Col. INIFAT	Sanjuanero	amarillo-naranja	semidentado

provenientes de la firma comercial Operon Technologies INC, Alameda, California, en la muestra 60. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 15 µl que contenían: 10mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM

KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cebador; 50 ng de ADN genómico; 1U de Taq ADN polimerasa (Go Taq DNA polymerase, Promega) y 0,4 mg/ml de suero de albúmina bovina. La amplificación se produjo

en un termociclador marca Master Cycler, programado para 45 ciclos de: 5 minutos a 94°C, 1 minuto a 93°C, 30 segundos a 36°C y 2 minutos a 72°C, y un ciclo de 7 minutos a 72°C. Los productos de las PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en solución amortiguadora TBE (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA), y se tiñeron con bromuro de etidio (12). El peso molecular de los fragmentos amplificados se estimó usando el marcador 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL). Las fotografías de los geles se tomaron en un fotodocumentador marca SYNGENE BIO IMAGING.

A partir de los resultados, teniendo en cuenta la cantidad de bandas amplificadas y la resolución obtenida en el gel, se seleccionaron los cebadores para el análisis de variabilidad con todas las muestras; se procedió según la metodología descrita anteriormente para la amplificación, separación y visualización de las bandas obtenidas.

Los productos de la PCR se informaron como presentes [1] o ausentes [0] para cada aceción y se creó una matriz de valores binarios. Se tuvieron en cuenta las bandas más intensas y con los datos alcanzados se calculó el índice de similitud entre cada par de accesiones, según Jaccard (13), los que se utilizaron para la construcción de un dendrograma empleando el método de Ward (14). La relación del agrupamiento obtenido con las características de las accesiones se determinó mediante un análisis factorial de correspondencia con el uso del programa InfoStat (15). El contenido de información polimórfica (PIC) se calculó según la fórmula  $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ , donde  $P_{ij}$  es la frecuencia del alelo  $j$  para el marcador  $i$  (16).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

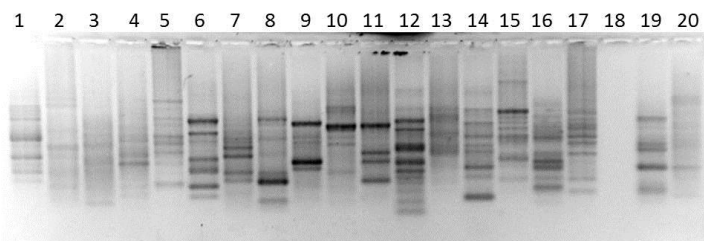
Con excepción del cebador OPA 18, el resto de los cebadores de la serie OPA rindieron productos de amplificación bajo las condiciones de mezcla de reacción y el programa de amplificación desarrollados. (Fig. 1)

Los cebadores OPA5, OPA6, OPA12, OPA15 y OPA19 se seleccionaron para el estudio de la variabilidad con todas las muestras de maíz, teniendo como parámetros de selección el número de bandas y la nitidez de las amplificaciones obtenidas.

Leal *et al.* (17) realizaron un estudio comparativo empleando marcadores RAPD y SSR en 10 genotipos de maíz. Estos autores usaron los 20 cebadores de las series OPA, OPB, OPC y algunos de las series OPF, OPL, OPM y OPP, para un total de 83 cebadores en el ensayo. En este estudio, los análisis RAPD dieron como resultado productos de variable intensidad, que se identificaron fácilmente, y bandas no específicas que se descartaron del análisis; de ahí que seleccionaron nueve cebadores con los que se realizó el estudio en los 10 genotipos, dos de los cuales pertenecen a la serie A: OPA3 y OPA12. Los nueve cebadores utilizados por estos autores rindieron 126 bandas y un promedio de 11,6 bandas por cebador.

Los cebadores empleados en el presente estudio fueron capaces de amplificar 85 bandas en total, todas polimórficas. El número de bandas por cebador osciló entre 13 y 21; se destacaron los cebadores OPA12 y OPA15 con 20 y 21 bandas, respectivamente (Tabla 2). El patrón de bandas generadas con los cebadores OPA12 y OPA15 se muestra en la Figura 2.

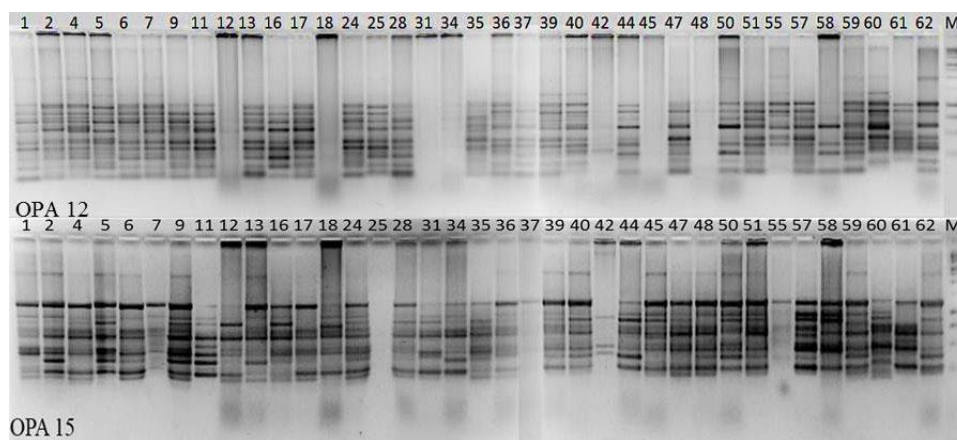
Sin embargo, el porcentaje de polimorfismo varía de acuerdo al marcador empleado. En estudios similares, Olivera *et al.* (18) detectaron 89,25 % de polimorfismo en 90 genotipos de maíz analizados; mientras que Mukharib *et al.* (19) estudiaron nueve genotipos con 28 cebadores (OPP1-10, OPK1-10, OPO1-06 y OPJ1-6), los cuales rindieron 189 bandas; de ellas 138 fueron polimórficas (73,02 % de polimorfismo) y un promedio de 6,75 bandas por cebador. Por su parte, Cholastova *et al.* (20) estimaron la diversidad genética entre 30 híbridos de maíz empleando marcadores RAPD y SSR. Para los estudios con RAPD utilizaron 37 cebadores, seis de los



**FIGURA 1.** Gel de electroforesis en agarosa al 1,5 % con los fragmentos generados por los cebadores de la serie OPA en la muestra 60. Líneas de la 1 a la 20 corresponden a los cebadores de la serie OPA del 1 al 20. / *Agarose (1.5 %) electrophoresis gel with fragments generated by kit OPA in the sample 60. Lanes 1 to 20 are OPA kit primers 1 to 20*

**TABLA 2.** Análisis del patrón de bandas generadas por los cebadores OPA5, OPA6, OPA12, OPA15 y OPA19 con las 37 accesiones de maíz. / *Analysis of the banding pattern generated by OPA5, OPA6, OPA12, OPA15 and OPA19 primers with the 37 maize accessions*

Cebador	Total de bandas amplificadas	Valor PIC
OPA5	13	0.743
OPA6	16	0.650
OPA12	20	0.709
OPA15	21	0.795
OPA19	15	0.717



**FIGURA 2.** Gel de electroforesis en agarosa al 1,5 % con los fragmentos generados por los cebadores OPA12 y OPA15 en las 37 accesiones de maíz. El número de las líneas coincide con los códigos mostrados en la [Tabla 1](#). / *Agarose (1.5 %) electrophoresis gel with fragments generated by primers OPA12 and OPA15 in the 37 accessions of maize. The lane number corresponds to the codes shown in [Table 1](#).*

cuales resultaron ser suficientes al proveer alto contenido de información polimórfica. De 53 fragmentos amplificados, 16 resultaron polimórficos (30 % de polimorfismo). El promedio del indicador PIC para los seis

cebadores fue 0,61 con un rango desde 0,44 a 0,82.

Los valores PIC brindan un estimado del poder discriminante de un locus, teniendo en cuenta no solo el número de alelos que son expresados, sino también la frecuencia relativa

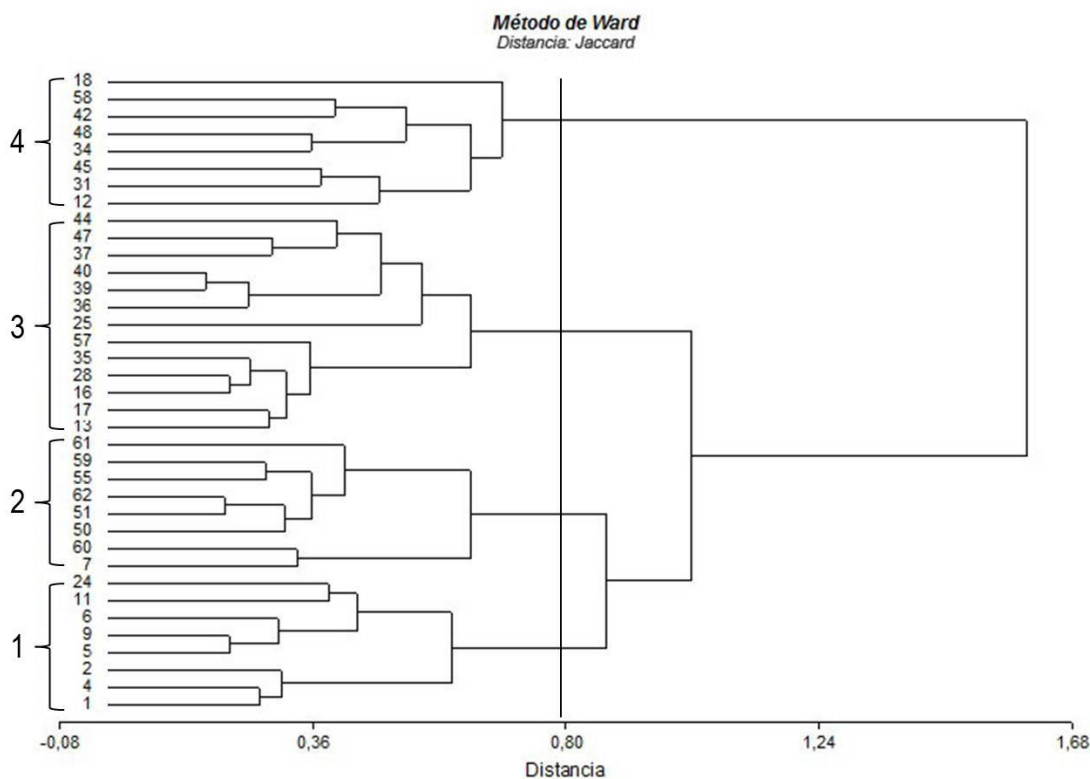
en que ellos aparecen (16, 21). Este índice puede tener valores entre 0 (para marcadores monomórficos) y 1 (para marcadores altamente discriminantes con muchos alelos en igual frecuencia). Los valores obtenidos en este experimento tuvieron como promedio 0,72; este se encuentra cercano a 1, valor máximo para un marcador de tipo dominante como los RAPDs.

Handi *et al.* (16) estudiaron la diversidad genética existente entre 56 líneas de maíz y obtuvieron 100 % de polimorfismo con algunos de los cebadores empleados de la serie OPA. Sin embargo, para otros cebadores de la serie OPK, estos autores encontraron porcentajes de polimorfismo inferiores, lo que sugiere que, para el cultivo del maíz, los cebadores de la serie OPA son más eficientes para la detección de polimorfismo. Los resultados del presente estudio coinciden con los de estos autores, pues se mostró que con la serie OPA se obtiene un elevado número de

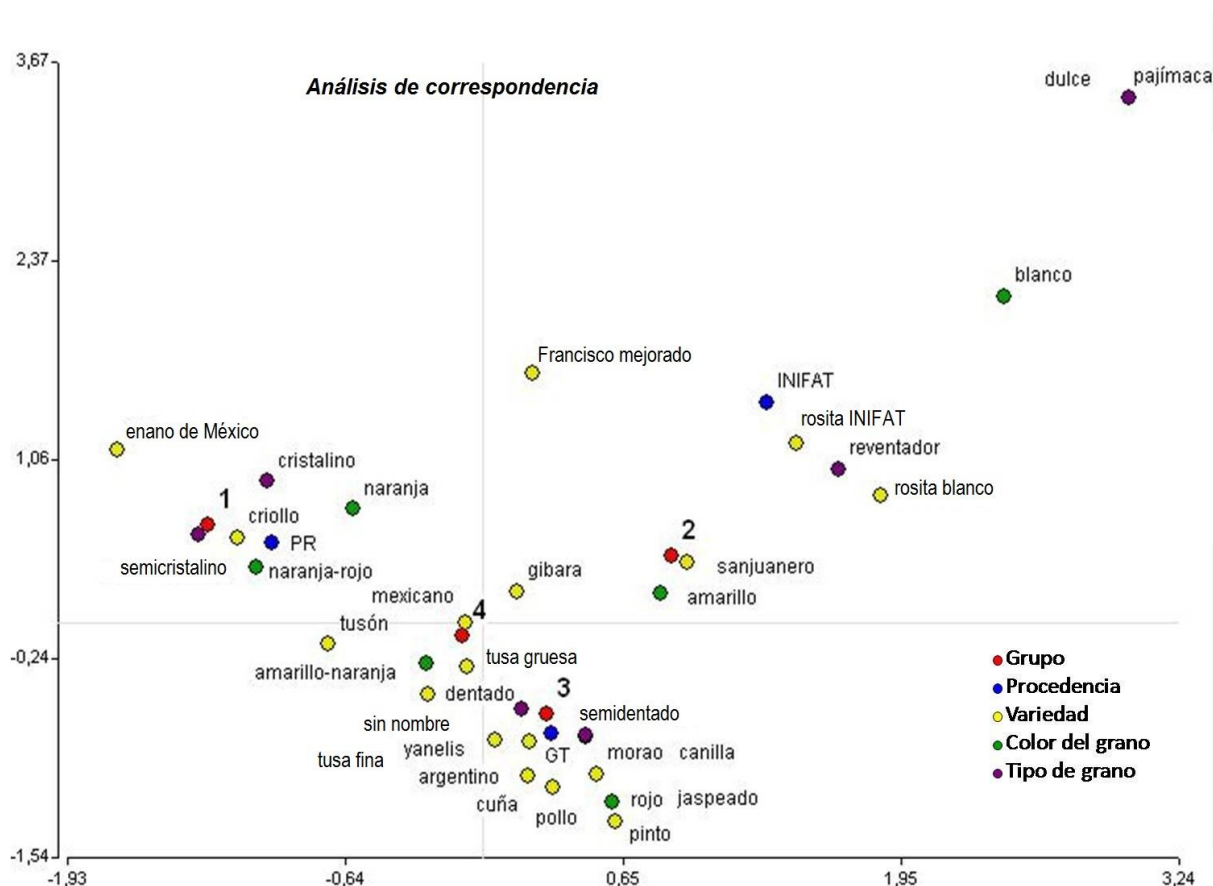
bandas, con altos porcentajes de polimorfismo por cebador y un índice PIC relativamente alto.

El dendrograma resultante de las distancias genéticas mostró la formación de cuatro grupos con 47 % de similitud (Fig. 3). De forma general, el agrupamiento mostró mayor relación con el lugar de procedencia de las accesiones que con el resto de las características. El grupo 1 quedó formado, principalmente, por accesiones colectadas en la provincia Pinar del Río. En el grupo 2 quedaron, en su mayoría, las variedades provenientes de la colección del INIFAT; mientras que las accesiones colectadas en la provincia Guantánamo se distribuyeron entre los grupos 3 y 4.

El análisis de correspondencia entre el agrupamiento y las características fenotípicas analizadas (Fig. 4) mostró que las accesiones de la variedad Criollo se agruparon, fundamentalmente, en el grupo 1. El resto de las variedades se encuentran indistintamente en



**FIGURA 3.** Dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas entre las 37 accesiones de maíz. / *Dendrogram obtained from the genetic distances among 37 maize accessions.*



**FIGURA 4.** Análisis de correspondencia entre el agrupamiento obtenido y las características de las 37 accesiones de maíz procedentes de dos sitios geográficamente distantes en Cuba. / *Correspondence analysis between the clustering obtained and the characteristics of the 37 maize accessions from two geographically distant places in Cuba.*

todos los grupos, aunque en diferente proporción. Las accesiones de color naranja y naranja-rojo se ubicaron en el grupo 1, las de color blanco y amarillo en el grupo 2, las de color jaspeado y rojo en el 3 y las de color amarillo-naranja en el grupo 4. Las accesiones con grano tipo cristalino y semicristalino se encuentran en el primer grupo, las de grano dulce y reventador en el segundo y las de grano dentado y semidentado se distribuyeron entre los grupos 3 y 4.

Estos resultados permiten plantear que en la región de Pinar del Río predomina el maíz con grano cristalino y semicristalino, de color naranja y naranja-rojo y la variedad Criollo; en Guantánamo el grano dentado y semidentado y los colores jaspeado, rojo y amarillo-naranja;

mientras que en la colección del INIFAT predomina el grano dulce y reventador y los colores blanco y amarillo, teniendo en cuenta la muestra analizada.

Mukharib *et al.* (19) encontraron que gran parte de la diversidad mostrada en los dendrogramas obtenidos en sus estudios con genotipos de maíz, mediante el empleo de RAPD, puede deberse a la amplia diversidad geográfica de los materiales analizados.

En otros estudios de diversidad genética del maíz realizados por Carvalho *et al.* (22), mediante marcadores RAPD con cebadores de diferente serie, se obtuvieron agrupamientos basados en características morfológicas de las accesiones empleadas, principalmente en el color del endospermo; mientras que Molin *et*

al. (23), con el uso de cebadores muy similares a los empleados por Carvalho, obtuvieron un dendrograma donde las accesiones se dividieron según el lugar de procedencia. En nuestro caso, la menor relación con características fenotípicas pudo deberse a la poca representatividad de algunas de las variantes en la muestra analizada, e incluso a la forma aleatoria empleada por los campesinos al nombrar las variedades con independencia del tipo y el color del grano.

Diferentes autores en sus estudios de diversidad en el cultivo de maíz han mostrado la tendencia del análisis utilizando diferentes marcadores, especialmente la combinación de marcadores RAPD y SSR. Algunos de estos estudios demostraron que los resultados con RAPD, al ser comparados con los de SSR, tienen una elevada correlación, lo que indica que ambas técnicas son eficientes para evaluar la diversidad genética en maíz, aunque los RAPD, en ocasiones, son capaces de detectar mayor polimorfismo (16, 18).

El presente estudio demostró una vez más la utilidad de los marcadores RAPD como herramienta para estudios de diversidad genética en cultivos de importancia económica y corroboró la variabilidad molecular existente en el cultivo del maíz en Cuba, lo que constituye una gran ventaja para los programas de mejoramiento, la conservación del banco de germoplasmas y el enfrentamiento a plagas y enfermedades.

## REFERENCIAS

1. Idowu SM, Cornelius OA, Olawale LA. Effect of liquid poultry manure application rate and injection depth on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in a sandy loam soil. *Agric Eng Int*. 2015; 17(1).
2. Balážová Z, Vivodík M, Gálová Z. Evaluation of molecular diversity of central European maize cultivars. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016; 28(2): 93-98.
3. El maíz en la nutrición humana. Depósito de documentos de la FAO. Capítulo 1. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s02.htm>. [Fecha de consulta: junio de 2013].
4. Martínez MC, Ortiz RP, Raigón MD. Contenido de fósforo, potasio, zinc, hierro, sodio, calcio y magnesio, análisis de su variabilidad en accesiones cubanas de maíz. *Cultivos Tropicales*. 2017; 38(1): 92-101.
5. Recursos genéticos. Disponible en: <http://www.fao.org/genetic-resources/es/>. [Fecha de consulta: marzo de 2018].
6. Semillas y recursos fitogenéticos: una base para la vida. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/crops/map-a-tematica-del-sitio/theme/seeds-pgr/es/>. [Fecha de consulta: marzo de 2018].
7. Fernández L, Crossa J, Fundora ZM, Gálvez G. Caracterización de razas cubanas de maíz mediante marcadores agromorfológicos en la colección nacional del cultivo. *Cultivos Tropicales*. 2009; 30(4): 62-70.
8. Fernández L, Crossa J, Fundora ZM, Gálvez G, Acuña G, Guevara C. Presencia de la variabilidad *ex situ* e *in situ* en el germoplasma cubano de maíz (*Zea mays* L.). Importancia de la complementación de ambos enfoques de conservación. *Cultivos Tropicales*. 2011; 32(4): 21-34.
9. Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. Hindawi Publishing Corporation. *Genetics Research International*. Volumen 2015, Article ID 431487, 14 pages
10. Alpana BK, Singh R, Chaudhury A, Dhawan AK, Kalia RK. Assessment of genetic variability through ISSR and RAPD markers in *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari. *Acta Physiol Plant*. 2015; (37):113.



11. Dellaporta SL, Word J, Hichs JR. A plant molecular DNA minipreparation, version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1983; (1):19-21.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor: N Y, USA; 1989.
13. Jaccard P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat.* 1901; (37): 547-579.
14. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Statist. Assoc.* 1963; (58): 236-244.
15. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat versión 2017.* Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
16. Handi S, Sasidharan N, Chakraborty S, Macwana S, Trivedi R, Singh BP, *et al.* Genetic diversity among maize varieties revealed by phenotypic descriptors and RAPD profiles. *The Journal of Agricultural Sciences.* 2013; 8(2): 91-106.
17. Leal AA, Mangolin CA, do Amaral ATJ, Gonçalves LSA, Scapim CA, Mott AS, *et al.* Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genet. Mol. Res.* 2010; 9(1): 9-18.
18. Oliveira OV, do Amaral ATJ, Gonzaga MP, Scapim CA, Pio AV, de Paiva SFJ, *et al.* Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. *Acta Sci. Agron.* 2008; (30): 25-30.
19. Mukharib DS, Patil VC, Biradar DP, Salimath PM, Chimmad VP. Assessment of molecular diversity in selected maize inbreds. *Karnataka J. Agric. Sci.* 2010; 23(3): 409-412.
20. Cholastova T, Soldanova M, Pokorny R. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) marker efficacy for maize hybrid identification. *African Journal of Biotechnology.* 2011; 10(24): 4794-4801.
21. Oladosu Y, Rafii MY, Abdullah N, Abdul MM, Rahim Ha, Hussin G, *et al.* Genetic variability and diversity of mutant rice revealed by quantitative traits and molecular markers. *Agrociencia.* 2015; 49(3): 249-266.
22. Carvalho V, Ruas C, Ferreira J, Moreira R, Ruas P. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology.* 2004; 27(2): 228-236.
23. Molin D, Coelho CJ, Máximo DS, Ferreira FS, Gardingo JR, Matiello RR. Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 2013; 12 (1): 99-114.