

## **Estudios citogenéticos y genético-bioquímico en cultivares de plátano fruta (*Musa spp*).**

M.I. Romàn\*, M.Alonso\*\*, C.González\*\*, X.Xiquès\*\*, I.Sánchez\*

\* Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. \*\*Facultad de Biología, Universidad de la Habana

### **Abstract:**

Cytogenetic and biochemical-genetic characterization were made on 9 cultivars and 2 species of banana (*Musa spp*) belonging to the collection of the INIVIT, Sto Domingo, Cuba. The diploid condition of these clones was proved showing  $2n=2x=22$  chromosomes. Isoenzymatic and total proteins analysis shown the existent variability among these clones and species. 88.5 % of the bands analyzed were polymorphic. Esterase isoenzymes showed the greatest polymorphism and can be used to identify clones because zymotypes were different in every one.

The first Cuban banana clone was evaluated considering phenotypic characters and isoenzymatic analysis. It showed to be a tetraploid clone with high yields. It is considered an important material in genetic improvement programs. This hybrid has more genetic affinity with its male parental.

### **Resumen**

Se realizó la caracterización citogenética y genético-bioquímica de nueve clones y dos especies de plátano fruta (*Musa spp*), pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara. Se comprobó la condición diploide de estos clones, con la presencia de  $2n=2x=22$  cromosomas.

El análisis isoenzimático y de las proteínas totales demostró la variabilidad existente entre los clones y especies, ya que del total de bandas analizadas, el 88.5% de ellas son polimórficas. Las isoenzimas esterases resultaron ser las de mayor polimorfismo, por lo que pueden ser utilizadas en la identificación de los clones, ya que se obtuvieron zimotipos diferentes para todos ellos. Se evaluó el primer híbrido cubano de plátano fruta, teniendo en cuenta las características fenotípicas y los análisis isoenzimáticos, constituyendo un clon tetraploide ( $2n=4x=44$  cromosomas), el cual presentó altos rendimientos y se considera un material importante en los programas de mejoramiento genético. Este híbrido tiene mayor afinidad genética con su progenitor masculino.

### **Introducción**

El cultivo del plátano (*Musa spp*) en los países de América Tropical y el Caribe, tiene especial importancia, no sólo porque forma parte de la dieta de sus habitantes, sino también, en virtud de los beneficios económicos que se derivan de las actividades bananeras y plataneras, medidos a través del establecimiento de fuentes de empleo, la generación de divisas e ingresos a los países. Su importancia y prioridad en el mejoramiento de los cultivos, ha servido de base para principales actividades en el área de recursos fitogenéticos a nivel mundial (Jaramillo, 1987).

En los últimos años, se han orientado diversos trabajos hacia el mejoramiento genético y es así como varios grupos de investigadores realizan esfuerzos para aumentar la variabilidad genética, lo cual es de gran importancia en la selección de clones de mayor productividad y que presentan resistencia a las plagas y enfermedades que atacan al género *Musa* (López y col, 1990).

Para tratar de mantener la variabilidad de especies domésticas y silvestres, se debe disponer de un método viable surgiendo, entonces, la idea de establecer los bancos de germoplasma para conservar la diversidad necesaria para los programas de fitomejoramiento (Perea, 1995).

Se han propuesto dos soluciones complementarias dirigidas a incrementar el manejo y conservación eficiente y sostenible del germoplasma. La primera, implica la identificación y eliminación de las accesiones duplicadas y la segunda, la creación de colecciones núcleo o representativas de la diversidad presente en toda la colección (Cornide y León, 1998).

Los estudios citogenéticos y genético-bioquímicos, brinda una mayor información para el manejo de una colección así como, permite desarrollar una metodología que evalúe de forma integral los genotipos (Román, 1996).

Los objetivos del presente trabajo son conocer el número cromosómico de diez cultivares de la colección cubana de plátano fruta (*Musa spp.*) y determinar las afinidades genéticas entre los clones y especies a través de los estudios genéticos bioquímicos.

### **Materiales y Métodos:**

Se estudiaron especies y clones pertenecientes a la colección cubana de plátano fruta (*Musa spp.*), (Tabla 1) sembrada de acuerdo a un Diseño Completamente Aleatorizado en el Instituto de Viandas Tropicales (INIVIT), de Santo Domingo, Villa Clara, en un suelo ferralítico rojo (Academia de Ciencias 1975).

Tabla 1. Clones y especies analizadas y la nomenclatura empleada.

<b><i>Clones y especies analizadas</i></b>	<b><i>Nomenclatura utilizada</i></b>
<b><i>Musa balbisiana</i></b>	<b>MB</b>
'Mundo'	<b>Mdo</b>
'BB. De Viet Nam'	<b>BBVN</b>
<b><i>Musa acuminata</i></b>	<b>MA</b>
'Chvoy tieu'	<b>CT</b>
'Tien taan ha'	<b>TTH</b>
'Paka'	<b>Paka</b>
'Mjenga'	<b>Mjenga</b>
'Ciento en Boca'	<b>CB</b>
'Datil'	<b>Datil</b>

### Caracterización citogenética:

Para el estudio del cariotipo de especies, clones, se tomaron raíces procedentes de cormos colocados en bolsas de polietileno, en condiciones de humedad.

Las raíces de aproximadamente 1 cm de longitud, fueron pretratadas con 8-hidroxiquinolina al 0.02% durante 3 horas, luego lavadas con agua destilada y fijadas en etanol-ácido acético (3:1). Las raíces se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1N a 60°C durante 12 minutos, antes y después de este proceso, fueron lavadas con agua destilada. Posteriormente, se sometieron a la tinción con hematoxilina-laca crómica durante 2 horas a 60°C y a continuación fueron los ápices colocados en portaobjetos con ácido acético al 45% para la realización del "squash".

El conteo cromosómico se realizó en 30 células por clon, empleando un microscopio óptico, marca Leitz, modelo Ortholux, con cámara fotográfica acoplada, modelo Orthomat. Las mejores metafases fueron fotografiadas, con un objetivo 100X y la lente de la cámara con un ocular 10X.

### Caracterización Genético-bioquímica

Para realizar los análisis electroforéticos de isoenzimas y proteínas totales, se tomaron hojas colectadas al azar en estado particular del desarrollo ontogenético de cigarro (Iglesias, 1980a).

Los extractos se prepararon, tomando 5g de hojas, macerados en N<sub>2</sub> líquido y utilizando un buffer de extracción bicarbonato de sodio 0.1M pH7.2; se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 minutos, a temperatura de 4°C, colectándose alícuotas de 1ml.

Las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos, se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% en lámina vertical y un sistema de buffer discontinuos (Orstein, 1964; Davis, 1964); con buffer de corrida Tris-Glicina 0.04M, pH 8.3. Para las proteínas totales fue empleado un sistema SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con concentración de 12.5% para el gel separador y 4% para el concentrador.

Una vez efectuada la separación, se realizaron las tinciones específicas, para la caracterización de los sistemas como se muestra a continuación:

<u>Sistemas</u>	<u>Método de Tinción</u>
Peroxidasas (E.C.1.11.1.7)	Iglesias, 1986
Polifenoloxidasas (E.C.1.10.3.1)	Guedes y Rodríguez, 1974
Esterasas (E.C.3.1.1)	González y González, 1981
Fosfatasa ácida (E.C.3.1.3.2)	Iglesias, 1986
Proteínas Totales	Laemmli, 1970

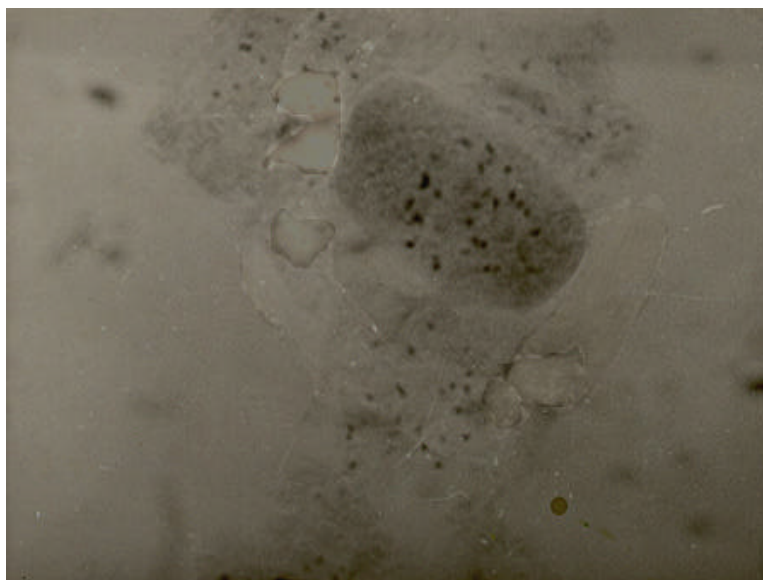
Se establecieron los fenotipos proteicos e isoenzimáticos de cada clon y especie sobre la base del número, posición y presencia de cada banda, considerando como cero la ausencia y como uno la presencia de bandas.

A partir de los resultados obtenidos en los zimogramas para los sistemas isoenzimáticos y de proteínas totales, se midieron las semejanzas entre los clones con el empleo del programa MAT-GEN (Sigarrosa y Cornide, 1995) para obtener la matriz de similitud a partir del índice de Apóstol, la cual fue analizada mediante un análisis de Conglomerados (Cluster) (Daviers, 1973).

Se determinó el número de loci para todos los sistemas isoenzimáticos las proteínas totales, el número de alelos en cada locus y el total de ellos así como el total de alelos raros, valor medio de alelos por locus y el porcentaje de loci polimórficos (Arias, 1998).

### **Resultados y Discusión:**

Se observó la presencia de  $2n=22$  cromosomas, al realizar el estudio de los ápices radiculares de los clones y especies analizadas (fig.1). Estos resultados demostraron su condición diploide, lo cual coincide con lo reportado por Cheesman y Later (1935); Simmonds (1966) y Sandoval y Escoute (1996).



*Fig 1. Células en división de clones y especies de plátano diploides ( $2n=2x=22$  cromosomas).*

La evaluación citológica de estos clones y especies, mostró que los cromosomas son relativamente pequeños y según Silayoi (1991), fluctúan entre 1.2 a 3.9  $\mu\text{m}$  de largo. Por otra parte, Osuji y col (1996) comprobaron que los cromosomas de *Musa* son principalmente metacéntricos, de acuerdo a la posición de la constricción primaria.

El estudio citogenético del género *Musa* ha sido poco estudiado, debido a las dificultades del análisis de sus pequeños cromosomas, a la poca frecuencia de células en división (Sandoval y Escoute, 1996). El presente estudio, mostró la factibilidad de la observación y análisis de los cromosomas, lo que en un futuro podría complementarse con el procesamiento y análisis digital de imágenes.

### Isoenzimas Peroxidasas

En la Fig 2 se muestra el zimograma correspondiente a las isoenzimas peroxidasas, donde se destaca un total de 8 bandas, de las cuales siete de ellas conforman los sistemas genéticos Px1 ,Px2 ,Px3 ,Px4 ,Px 5,Px6 y Px7, cada uno con una banda.

Las bandas de mayor migración anódica pertenecientes a Px1 y Px2 son comunes a todos los clones del grupo genómico acuminata (AA), donde están agrupados 'Paka', 'Mjenga', 'Datil', 'Tien taan ha', 'Ciento en Boca', 'Chovy Tieu' y la especie *Musa acuminata*; dentro del sistema Px3, la banda que aparece, es común a todos los clones.

La banda de menor migración, es propia de 'Datil' y 'Ciento en Boca', clones muy afines morfológicamente. Las bandas presentes en los sistemas Px4, Px5 y Px6 son comunes a 'BB de Viet Nam', 'Mundo' y la especie *Musa balbisiana*, los que se corresponden con el genoma balbisiana (BB).

Jarret y Litz (1986c) y Bhat y col (1992b) han señalado varias zonas de actividad peroxidasa muy polimórficas, trabajando con otros genotipos del género *Musa*, lo que parece indicar que este sistema es específico y uniforme dentro de cada grupo, esto coincide con los trabajos precedentes realizados por Román y Manzano (1991), Lebot y col (1993) y Martínez y col (1998) para este cultivo.

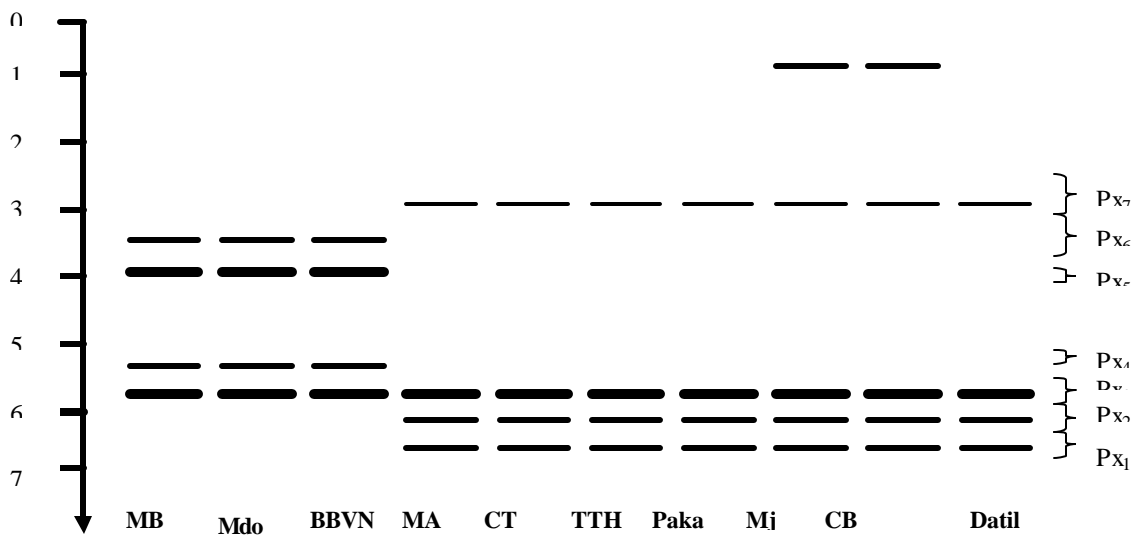


Fig 2. Zimograma obtenido para las isoenzimas peroxidasas

### Isoenzimas Polifenoloxidasas

Se encuentra un total de 5 bandas, de las cuales una de ellas está presente en todos los clones y especies. Aparecen 5 sistemas genéticos nombrados PPO1, PPO2, PPO3, PPO4 y PPO5, con una banda cada uno (Fig 3).

La banda perteneciente a PPO2 y a PPO3 está presente en los clones 'BB de Viet Nam', 'Mundo' y la especie *Musa balbisiana*, los que se corresponden con el genoma balbisiana (BB) y la banda del sistema PPO4 aparece en los clones 'Paka', 'Mjenga', 'Tien taan ha', 'Chovy tieu' y la especie *Musa acuminata* de genoma acuminata (AA). La presencia de estas bandas demuestra la existencia de patrones propios en los clones de grupo genómico (BB) y (AA).

En general, existen dos zonas diferentes, una de migración rápida (PPO1 y PPO2) y otra de migración lenta (PPO3, PPO4 y PPO5); con la presencia de polimorfismo para algunos de los clones. Estos resultados no se corresponden con lo reportado por Matarroyos y col (1998) en yuca, González y col (1998) en tabaco y Florido (1999) en tomate, donde plantean la presencia de un marcado monomorfismo, para la mayoría de los sistemas genéticos de estas isoenzimas.

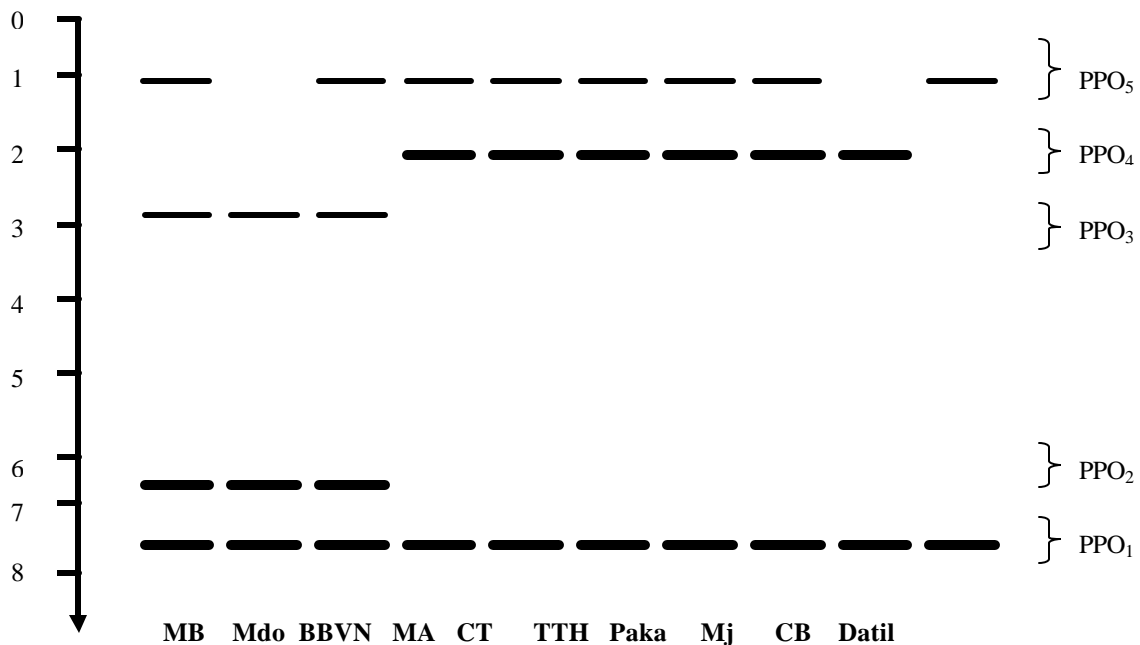


Fig 3. Zimograma obtenido para las enzimas polifenoloxidasas

### Isoenzimas Fosfatasas ácidas

El zimograma de este sistema (Fig 4) muestra un total de 9 bandas, agrupadas en los sistemas AcP<sub>1</sub>, AcP<sub>2</sub>, AcP<sub>3</sub>, AcP<sub>4</sub>, AcP<sub>5</sub> y AcP<sub>6</sub>, de las cuales 3 bandas son comunes a todos los cultivares siendo propias del género.

La banda de mayor migración del sistema AcP<sub>1</sub>, está presente en los clones ?Paka?, ?Mjenga?, ?Datil?, ?Tien taan ha?, ?Ciento en Boca?, ?Chvoy tieu? y la especie *Musa acuminata*, permitiendo agrupar a los clones de genoma acuminata (AA). Se presentan bandas propias, que caracterizan el patrón isoenzimático de los clones ?Paka?, ?Ciento en Boca? y ?Mundo?.

La ausencia de las bandas de los sistemas AcP<sub>5</sub> y AcP<sub>6</sub> en los clones ?BB de Viet Nam?, ?Mundo? y la especie *Musa balbisiana* demuestra que las mismas son propias del genoma acuminata.

Bhat y col (1992) al analizar 44 cultivares del género *Musa*, procedentes de la India encontraron un mayor número de bandas con un patrón enzimático característico para los cultivares del grupo balbisiana (BB) y del grupo genómico acuminata (AA), coincidiendo con los resultados obtenidos para este sistema en los clones y especies estudiados.

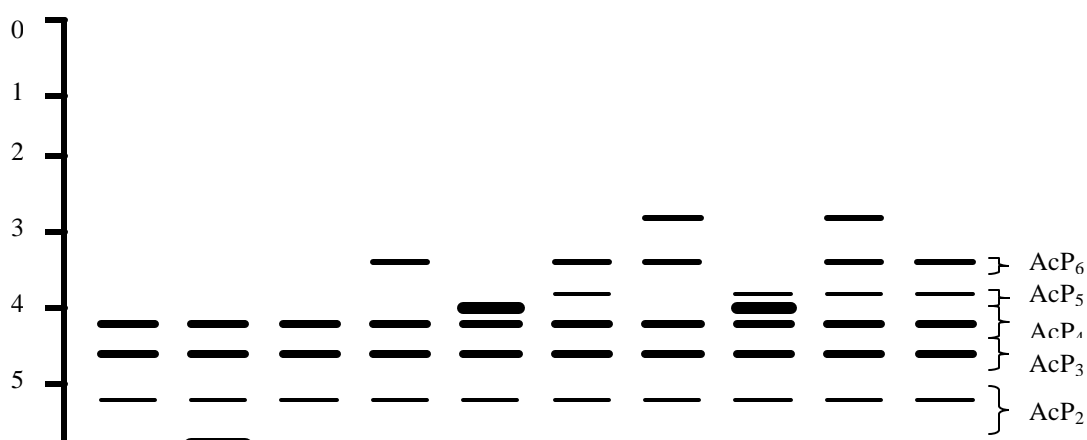


Fig 4. Zimograma obtenido para las enzimas fosfatasas ácidas

**Isoenzimas Esterasas**

Dentro de este sistema se aprecia un mayor polimorfismo, dado por la presencia de 14 bandas, agrupadas en los sistemas Est<sub>1</sub>, Est<sub>2</sub>, Est<sub>3</sub>, Est<sub>4</sub>, Est<sub>5</sub>, Est<sub>6</sub>, Est<sub>7</sub>, Est<sub>8</sub>, Est<sub>9</sub>, Est<sub>10</sub> y Est<sub>11</sub>; con una serie de bandas propias en los clones ?Ciento en Boca?, ?Datil?, ?Tien taan ha ?, ?Chvoy tieu?, lo cual constituye un total de 18 bandas (Fig 5).

Las bandas de los sistemas Est<sub>9</sub> y Est<sub>10</sub> son comunes a todos los clones y en el resto de los sistemas, se presentan una serie de bandas que caracterizan el patrón isoenzimático de cada clon y especie, ya que no existen patrones idénticos.

Este sistema permite diferenciar los clones por el alto grado de polimorfismo que presentan, lo cual parece estar relacionado con el origen de los mismos. Por esta razón no es un sistema útil para agrupar los clones por su grupo genómico, pero si identificarlos, ya que cada clon ha presentado patrones propios.

Este estudio ha hecho posible establecer que ciertos clones muy afines en morfología, no constituyen duplicados como por ejemplo ?Datil? y ?Ciento en Boca?. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Horry (1985) en trabajos con clones cultivados “in vitro”, donde encontró un alto polimorfismo en este sistema, para los diferentes genotipos estudiados.

Jarret y Litz (1986b y c) y Bhat y col (1992a) reportan la aparición de 14 a 30 bandas respectivamente en el sistema enzimático esterasa, lo que coincide con el número de bandas detectadas en este sistema. Señalan que esta variación se debe a la presencia de bandas menores relacionadas con estadios fisiológicos de la planta.

El grado de variabilidad para este sistema, tanto en el número de loci como en el número de alelos detectados por locus, ha sido reportado por autores como Román y Manzano (1991), Horry (1993) y Reyes y col (1997;1998) al analizar otros clones de plátanos con diferentes ploidías, por lo que esta enzima puede ser usada para pruebas de diagnóstico en la identificación de clones.

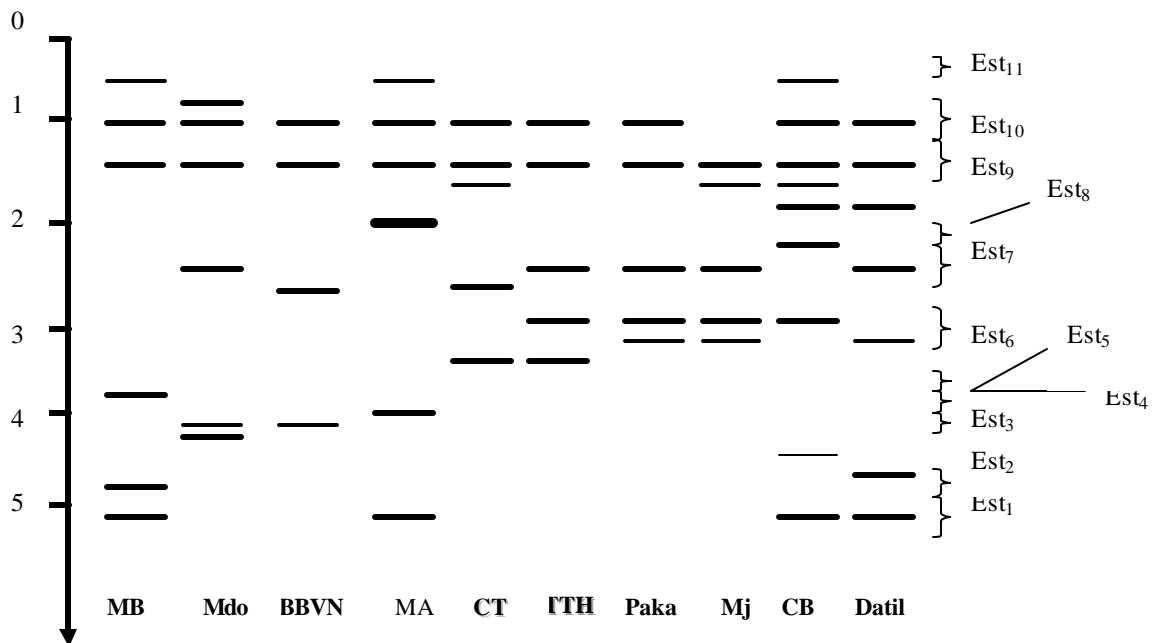


Fig5. Zimograma obtenido para las enzimas esterases

**Proteínas totales**

En la Fig 6 se puede observar un total de 12 bandas, que constituyen los sistemas: Pt<sub>1</sub>, Pt<sub>2</sub>, Pt<sub>3</sub>, Pt<sub>4</sub>, Pt<sub>5</sub>, Pt<sub>6</sub>, Pt<sub>7</sub>, Pt<sub>8</sub>, Pt<sub>9</sub> y Pt<sub>10</sub>, de las cuales una sola banda es común a todos los cultivares.

El polimorfismo presente por estas proteínas, viene dado por la presencia de las bandas de los sistemas Pt<sub>1</sub> y Pt<sub>7</sub> en los clones pertenecientes al grupo genómico balbisiana(BB) y por las bandas del sistema Pt<sub>4</sub> en los clones de genoma acuminata (AA) así como la aparición de una banda propia en la especie *Musa balbisiana*.

En la mayoría de los clones, los resultados de los electroforetogramas para las proteínas totales, muestra una gran diferencia de bandas y las variaciones entre las entidades están dadas por la ausencia de algunas de estas. Resultados similares son mencionados por Reyes y col (1997) y Acosta (1999) en el género *Musa*, así como en otras especies, en cítricos (González, 1989) y en tomate (Florida, 1999).

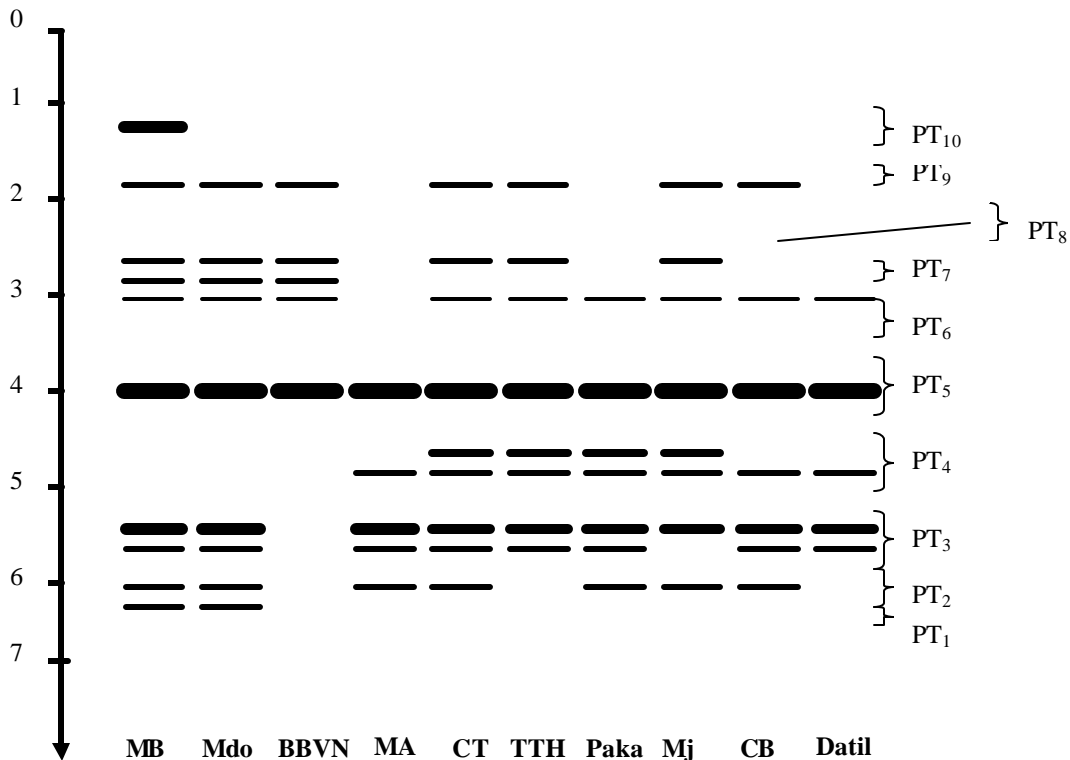


Fig 6. Proteinograma obtenido para las proteínas totales.

En general, los resultados obtenidos en los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales, han mostrado la existencia de una gran heterogeneidad para los clones y especies, ya que del total de bandas analizadas, el 82% de ellas son polimórficas y están representadas en los sistemas estudiados.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis cuantitativo de los zimogramas para los clones y especies analizados.

Tabla 2. Análisis cuantitativo de los zimogramas de los clones y especies analizados.

Sistema enzimático	Total de loci	Total de bandas	Total de alelos raros	X de alelos por locus	Total de loci polimórfico	% loci polimórfico
<b>Peroxidasas</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1.0</b>	<b>6</b>	<b>85.7</b>
<b>Polifenoloxidasas</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>4</b>	<b>80.0</b>

<b>Fosfat. ácidas</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1.3</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>
<b>Esterasas</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>1.2</b>	<b>10</b>	<b>90.9</b>
<b>Proteínas Tot.</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>1.2</b>	<b>9</b>	<b>90.0</b>
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>52</b>	<b>6</b>	<b>1.1</b>	<b>32</b>	<b>82.0</b>

El sistema mas polimórfico resultó ser esterazas con un 90.9%, seguida de las proteínas totales con un 90% y las fosfatasas ácidas, resultaron la de menor polimorfismo, con un 50%.

Se puede apreciar que el sistema isoenzimático de las esterazas y las proteínas totales, permiten diferenciar los clones y las especies, ya que mostraron patrones característicos para cada uno de ellos, lo que concuerda con lo reportado por Jarret y Litz (1986b y 1986c), Reyes y col (1998) en cultivares del género *Musa*.

Las fosfatasas ácidas mostraron coincidencia en los cultivares *Musa balbisiana* y 'BBVN' y para 'Tien taan ha' y 'Datil', los cuales presentaron patrones de bandas idénticas. El resto de los clones se pudieron diferenciar por sus patrones característicos.

Las polifenoloxidasas permitieron separar a los clones 'Datil' y 'Ciento en Boca' que tienen afinidades morfológicas así como al clon 'Mundo'. Sin embargo, nos indica semejanzas por la identidad de sus patrones, entre los clones 'Paka', 'Mjenga', 'Tien taan ha', 'Chvoy tieu' y la especie *M.acuminata*, pertenecientes al grupo genómico acuminata (AA).

El dendrograma confeccionado con los índices de similitud de Apostol de los sistemas enzimáticos y proteínas totales se presentan en la Fig 7.

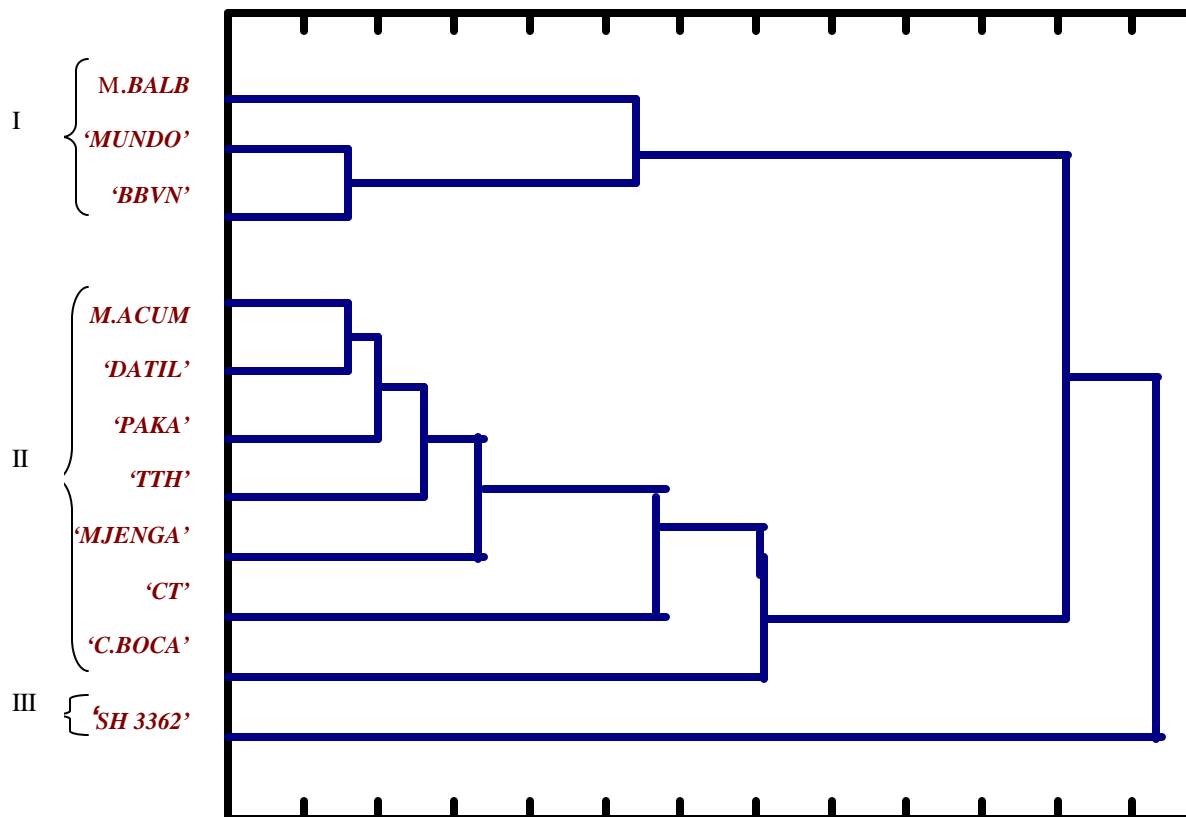


Fig 7. Dendrograma obtenido mediante el análisis de Conglomerados de los resultados de los sistemas enzimáticos y las proteínas totales.

Se forman dos grupos, los que presentan gran diferencia, ya que el valor del índice de similitud es de 0.62. Lo anterior puede explicarse por las diferencias genéticas que existen entre los clones, pues pertenecen a grupos genómicos diferentes (Román y Manzano 1991, Román 1996) y se distinguen por sus patrones electroforéticos, a pesar de que todos tienen el mismo número de cromosomas.

El grupo I, corresponde a los clones de genoma balbisiana (BB) y que comprende a ? Mundo ?, ? BB de Viet Nam ? y la especie *Musa balbisiana*, los cuales están muy relacionados por sus características fenotípicas y genotípicas.

El grupo II incluye a los de genoma acuminata (AA), donde se ubican los clones ? Chvoy tieu ?, ? Tien taan ha ?, ? Mjenga ?, ? Paka ?, ? Datil ?, ? Ciento en Boca ? y la especie *Musa acuminata*, los que presentan coincidencia en los patrones de bandas para algunos de los sistemas analizados y valores de rendimiento intermedio, dado por la altura del pseudotallo, el peso del racimo y el número de manos por racimo.

Los resultados de la evaluación citogenética e isoenzimática permitió caracterizar y diferenciar los clones de importancia económica de acuerdo al grupo genómico, coincidiendo estos resultados con los encontrados por Lebot y col, 1993; Perrier, 1993 y Román, 1996 en otros genotipos del género *Musa*.

## Conclusiones

- Las especies de *Musa spp* y los clones analizados poseen un número cromosómico de  $2n=2x=22$ , lo que comprueba su condición de diploide.
- El estudio electroforético de las isoenzimas y las proteínas totales, permitió detectar diferencias entre los clones y las especies, así como caracterizarlos y agruparlos de acuerdo al grupo genómico.
- El sistema isoenzimático esterasas, mostró el mayor polimorfismo en sus patrones de bandas, por lo que pueden ser empleadas para pruebas de diagnóstico en la identificación de clones.

## Referencias Bibliográfica

- Academia de Ciencias de Cuba (1975). Segunda clasificación genética de los suelos de Cuba. **Serie Suelos** 23:3-15.
- Acosta, R (1999). Caracterización citogenética, genético-bioquímica y morfoagronómica de diez clones de plátano 'Burro' (*Musa spp*, Grupo ABB). Tesis de diploma. 65pp.
- Bhat, K; P, Chandel (1992a). Survey of isoenzyme polymorphism for clonal identification in Musa. I. Esterase, ac phosphatase and catalase. **J. Hort. Sci** 67(4): 501-507.
- Bhat, K; S, Bhat; K, Chandel (1992b). Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in Musa II. Peroxydase, superoxidase dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dihydrogenase. **Journal of Horticulture Science** 67(6): 737-743.
- Cornide, M.T; O, León (1998). Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. CNIC. Pp 18-25.
- Cheesman, E y L. Larter (1935). Genetical and cytological studies of *Musa*. III chromosomes number in the Musaceae. **J. Genet.** Vol 30:31-52.
- Daviers, J.C (1973). **Statistics and data analysis in geology**. I. Winley, Sans Inc. 536pp.
- Davis, B.J (1964). Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N.Y. **Acad. Sci.** 12:404-427.
- Florido, M (1999). Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfo-bioquímicas y tolerancia al calor. Tesis de Maestría. 87pp.
- González, C (1989). Comportamiento genético-bioquímico de la Lima persa SRA-58 (*Citrus latifolia* Tan) sobre diferentes patrones en Cuba. Tesis presentada en opción del grado de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas. 100pp.
- González, C.T; J.A, González (1981). Estudio de patrones para la Lima persa III. Caracterización isoenzimática. **Cienc-Téc. Agric.** VOL 4(2): 102-108.
- Guedez, M; C.I, Rodríguez (1974). Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. De Portugal. Acta Biologica. Serie A, Vol XIII: 169-177.
- Horry, J.P (1985). Mise and point d' une technique de caracterización de quelques genotypes de bananiers (*Musa spp*) cultives "in vitro" por electroforese des esterasase. **Fruits** 40(13): 785-788.

- Horry, J.P (1993). Taxonomy and genetic diversity of diploid bananas. Breeding Banana and Plantain for resistance to diseases and pest. Montpellier. France. Part Plant Related Constraints, 35-42pp.
- Iglesias, L (1980a). Relación entre la constitución genómica e isoenzimática peroxidadas en el género *Musa*. **Cultivos Tropicales**. Vol 2:143-156.
- Iglesias, L (1980b). Estudio morfológico y bioquímico de cuatro especies del género *Musa*. **Cultivos Tropicales**. Vol 2(3): 103-114.
- Iglesias, L (1986). Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en Soya (*Glicine max L. Merrill*). Tesis de candidatura. 185pp.
- Iglesias, L (1988). Aplicación de la técnica electroforética en el manejo de los recursos fitogenéticos. Conferencia.6pp..
- Jaramillo, R (1987). La red internacional para el mejoramiento de banano y plátano (INIBAP). **Asbana** 11(27): 21-22.
- Jarret, R (1990). Molecular methods for detecting genetic diversity in *Musa*. In identification of genetic diversity the genus *Musa*. (R.L.Jarret. Ed.) INIBAP,France. Pp 8-16.
- Jarret, R; R, Litz (1986b). Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. **Euphytica** 33:539-550.
- Jarret, R; R, Litz (1986c). Enzyme polymorphism in *Musa acuminata Colla*. **J. of Heredity** 77:183-186..
- Laemmli, U.K (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.
- Lebot, V; R, Manshardt; B, Meilleur (1993). Genetic relationship among cultivated bananas and plantains from Asia and the Pacific. **Euphytica** 67:163-175.
- López, J;De la C, Ventura; A, Rodríguez; C.M, Rivera (1990). Comportamiento de tres clones de plátano Burro (Grupo ABB) en las condiciones de Cuba. MINAG. Pp 34-38.
- rsity study. **Bioch.Syst.Ecol.** 24(2): 165-170.
- Martínez, L; C, Golmorini; M, Havey; R, Masuelli (1998). Obtention of molecular markers by PCR linked to pink root resistance in onion (*Allium cepa L*). En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convecciones de La Habana. Junio 1-5. 240pp.
- Matarroyos, A.A.V; P.C.L, De Carvalho; W.S.F, Aguiar; E.O, De Santos; J.C.E, De Franca (1998). Caracterización isoenzimática de variedades de yuca pertenecientes al banco de germoplasma de IPA. En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convecciones de La Habana. Junio 1-5. 240pp.
- Orstein, L (1964). Disc electrophoresis. Back ground and theory. **Ann.N.Y.Acad. Sci** 121:321-349.
- Osuji, J.O; B.E, Okoli; R, Ortiz (1996). An improved procedure for mitotic studies of the Eumusa section of the genus *Musa L.*(Musaceae). **Infomusa** 5(1): 12-14.
- Osuji, J.O (1997). Multivariate pattern of quantitative tract variation in triploid banana and plantain cultivars. **Scientia Horticulture** 71: 197-202.
- Perrier, X (1993). Numerical analysis of genetic diversity in banana. Breeding Banana and Plantain for resistance to deseases and pest. Montpellier. France. Part I: Plant Related Constraints.23-24pp.
- Reyes, L.M; O. Martínez; M. Beltrán (1997). Isozyme analyses of *Musa* clones maintained at in vitro conditions. **Hortscience** 32(3): 441-442.
- Reyes, L.M; O. Martínez; M. Beltrán (1998). Quimiovariabilidad en el género *Musa*. II. Caracterización genética mediante nueve sistemas enzimáticos. **Infomusa** 7(1): 6-10.
- Román, M.I y A. Rodríguez Nodals (1986). Estudios citogenéticos e implicaciones taxonómicas en ocho cultivares de plátano (*Musa spp*). **Cienc. Tec. Agric. Viandas Tropicales**. Vol 7(1): 7-14.
- Román, M.I; M.J. Manzano; J. López y A.A Rodríguez (1988). Estudio de la fertilidad del polen en cultivares de plátano (*Musa spp*). **Cienc. Tec. Agric. Viandas Tropicales**. Vol 7(1): 17-30.
- Román, M.I y M.J. Manzano (1991). Estudio bioquímico en diez clones del subgrupo Cavendish. **Agrotecnia de Cuba**. Vol 23(3-4), 13-18.
- Román, M.I (1996). Estudio morfológico, bioquímico y de fertilidad del polen en clones diploides de plátano fruta (*Musa spp*). Tesis de Maestría en Ciencias .38pp.
- Sandoval, J.A; J, Escoute (1996). Aspectos citológicos y descripción de una metodología para el conteo de los cromosomas en el género *Musa*. **Corbana** 21(45): 51-56.
- Sandoval, A.J; L, Pérez; F, Cote (1997). Estudio morfológico y de la estabilidad genética de las plantas variantes de banano (*Musa AA*Acv. 'Gran Enano'). Etapas de cultivo "in vitro", alimentación y campo. **Corbana** 22(48): 41-60.

- Scandalios, J.G (1974). Isozymes in development and differentiation. **Ann. Rev. Plant Physiol.**25: 225-258.
- Sigarroat, A (1985). **Biometría y Diseño Experimental.** La Habana. Pueblo y Educación. 743pp.
- Sigarroat, A; M.T, Cornide (1995). Manual MAT-GEN. Manual del usuario. Folleto, Facultad de Biología, 37pp.
- Silayoi, B (1991).Chromosomes numbers and karyotypes of some thai bananas. **Journal of Kasetsart Science**, 25:400-407.