

## ESTANDARIZACION DE SISTEMAS ISOENZIMATICOS EN CLONES COLOMBIANOS DEL GENERO *MUSA*<sup>1 (\*)</sup>

### Standardization of Isozymic Systems in clones of the Colombian Collection of the genus *Musa*

Margarita Beltrán<sup>2</sup>, Luz Marina Reyes C<sup>3</sup>. y Orlando Martínez W<sup>4</sup>.

#### RESUMEN

Con el propósito de estudiar la variabilidad genética presente en la Colección Colombiana de Musáceas, se estandarizaron varios sistemas enzimáticos en clones de diferentes ploidías, conservados bajo condiciones *in vitro*. Se probaron un total de 23 sistemas, seis de los cuales presentaron actividad electroforética en condiciones diferentes a las previamente reportadas por otros autores: Diaforasa (**DIA** E.C.1.6.4.3.), Enzima málica (**ME** E.C.1.1.1.40.), Fosfoglucoisomerasa (**PGI** E.C.5.3.1.9.), Fosfogluconato deshidrogenasa (**PGDH** E.C.1.1.1.44.), Fosfoglucomutasa (**PGM** E.C.2.7.5.1.) y Rubisco (**RUB** E.C.4.11.1.39.). Las enzimas **DIA** y **RUB** se reportan por primera vez para el género *Musa*, **ME**, **GDH**, **PGDH** y **PGI** se reportan por primera vez en geles de acrilamida. Diaforasa presentó alto polimorfismo en los clones probados, mientras que Rubisco mostró una sola zona de actividad.

\* Recibido en Diciembre de 1996

1 Trabajo realizado en los laboratorios del Programa Nacional de Recursos Genéticos Vegetales de CORPOICA, con el apoyo de INIBAP y COLCIENCIAS.

2 Bióloga, Universidad de los Andes.

3 Profesor Asociado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

4 Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

**Palabras claves:** Marcadores bioquímicos, isoenzimas, cultivo de tejidos, *Musa*.

#### SUMMARY

The main purpose of this study was the standardization of several isozymic systems using clones of different ploidy belonging to the Colombian Collection of *Musa* maintained under *in vitro* conditions. A total of 23 systems were assayed. Six isozymes presented new electrophoretic activity with regard to previous reports: Diaphorase (**DIA** E.C.1.6.4.3.), Malic enzyme (**ME** E.C.1.1.1.40) Phosphoglucoisomerase (**PGI** E.C.5.3.1.9.), Phosphogluconate dehydrogenase (**PGDH** E.C.1.1.1.44.), Phosphoglucomutase (**PGM** E.C.2.7.5.1.) and Rubisco (**RUB** E.C.4.11.1.39.). The enzymes **DIA** and **RUB** are reported the first time for the genus *Musa*. **ME**, **GDH**, **PGDH** and **PGI** are described the first time in acrylamide support. **DIA** presented high level of polymorphism in the Colombian clones tested. **RUB** showed only one zone of activity.

**Key words:** Biochemical markers, isozymes, tissue culture, *Musa*.

#### INTRODUCCION

La electroforesis de proteínas es una herramienta de investigación que se utiliza en diferentes disciplinas biológicas. En particular, los análisis isoenzimáticos han permitido avanzar en el campo de la biología sistemática y evolutiva (Tanksley y Orton, 1983).

Una de las razones para utilizar las técnicas electroforéticas es que las isoenzimas proveen la posibilidad de marcar genes para análisis de herencia y variabilidad genética (Tanksley y Rick, 1980).

En el género *Musa*, se han utilizado ampliamente las isoenzimas como marcadores genéticos y los resultados obtenidos han servido para la identificación clonal, la determinación de duplicados en una colección, el monitoreo de la estabilidad genética en los clones, la determinación de la diversidad alélica en una colección o en germoplasma originario de diferentes áreas geográficas y para la identificación de híbridos vía fusión de protoplastos, cuyo énfasis principal es el estudio de la evolución, la taxonomía y la medida de la variación somaclonal (Horry, 1989; De Langhe, 1990; Espino y Pimentel, 1990; Jarret y Litz, 1986 a, b y c; Jarret, 1990; Bhat *et al.*, a, b, 1992; Lebot *et al.*, 1993).

En general, los trabajos que se han realizado han sido en subespecies diploides fértiles de *M. acuminata* y *M. balbisiana* y cultivos comerciales de varios niveles de ploidía. Usando electroforesis en geles de almidón y poliacrilamida, se han logrado identificar y caracterizar loci que codifican determinadas enzimas, las cuales presentaron un alto nivel de discriminación entre los cultivares (Jarret y Litz, 1986 b y c; Bhat *et al.*, 1992 a y b; Lebot *et al.*, 1993).

Se han reportado unas 18 enzimas en el género *Musa*, de las cuales las más altamente polimórficas son Tetrazolium oxidasa (TO) (Jarret, 1987), Esterasa (EST), Fosfatasa ácida (ACP) (Jarret, 1987; Bhat *et al.*, 1992a); Glutamato transaminasa (GOT), Fosfoglucomutasa (PGM), Deshidrogenasa Shikímica (SKDH) (Jarret y Litz, 1986 a y b) y Peroxidasa (PRX) (Bonner *et al.*, 1974; Bhat *et al.*, 1992b) y se emplean, especialmente, para diferenciación entre clones.

Las técnicas tradicionales, como la descripción de fenotipos (morfoloxonomía), complementada con métodos como la quimiotaxonomía (isoenzimas) y la biología molecular facilitan la caracterización de especies o subespecies y ayudan a identificar

microcentros genéticos y, posiblemente, un origen geográfico más exacto de los clones de plátano y banano, hoy en día cultivados; y éstas son las principales herramientas para la evaluación y mejoramiento de cultivos (Jarret, 1987).

El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar diferentes sistemas isoenzimáticos para la posterior caracterización bioquímica de la Colección Colombiana de Musáceas, con el fin de identificar los posibles duplicados presentes en la colección y determinar el grado de variabilidad genética presente en la misma.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Vegetal

El material vegetal que se empleó en este estudio se tomó, originalmente, de la Colección Colombiana de Musáceas (CCM) del Centro Experimental El Agrado (Municipio de Montenegro, Quindío). Parte de la colección se mantiene bajo condiciones *in vitro* en el laboratorio de Recursos Genéticos Vegetales de CORPOICA Tibaitatá (Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca). (Cuadro 1).

Se utilizaron 15 clones de diferente ploidía (plátanos y bananos) mantenidos en condiciones *in vitro*, utilizando el medio de micropropagación reportado por Krikorian (1990).

### Electroforesis de Isoenzimas

Se probaron ocho sistemas de extracción para la obtención de las proteínas solubles. El medio que permitió mayor resolución fue el reportado por Jarret y Litz (1986) y modificado en este estudio: Tris HCl 0,1 M pH 7,5; PVPP 5%; Sucrosa 10%; DTT 10 mM; Tritón X-100 0,1%, incorporándole 2-Mercapto etanol (14 mM), como elemento nuevo.

Para la extracción de las proteínas, se tomó 0,5 g de tejido foliar joven de las vitroplantas y se colocó sobre papel filtro húmedo y frío. La muestra se maceró en nitrógeno líquido y se adicionaron 1,5 ml de buffer de extracción. La mezcla se colectó en tubos eppendorf, previamente marcados y enfriados. Las muestras se centrifugaron a 5500 r.p.m.

**CUADRO 1.** Clones de la CCM utilizados para la caracterización bioquímica mediante isoenzimas (1-10 bananos; 11-15 plátanos).

No.	Nombre Común	Especie/Grupo	Subsp/subgr
1	Siam	<i>M. acuminata</i> spp. (AA)	Siamea
2	Bocadillo chileno	Diploide derivado <i>M. acuminata</i> (AA)	Sucrier
3	Banano 2	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Gros Michel
4	Seredow	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Cavendish
5	Gran Enano	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Cavendish
6	Pigmeo	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Cavendish
7	Poyo	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Cavendish
8	Guayabo A	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Red
9	Tafetán Rojo	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Red
10	Tafetán Verde	Triploide derivado <i>M. acuminata</i> (AAA)	Red
11	Truncho	Triploide <i>M. acuminata</i> X <i>M. bal-</i> <i>bisiana</i> (AAB)	Plantain
12	Cachaco Común	Triploide <i>M. acuminata</i> X <i>M. bal-</i> <i>bisiana</i> (ABB)	Bluggoe
13	Cachaco Espermo	Triploide <i>M. acuminata</i> X <i>M. bal-</i> <i>bisiana</i> (ABB)	Bluggoe
14	Mutant Palmira	Triploide <i>M. acuminata</i> X <i>M. bal-</i> <i>bisiana</i> (ABB)	Saba
15	Saba	Triploide <i>M. acuminata</i> X <i>M. bal-</i> <i>bisiana</i> (ABB)	Saba

durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante en alícuotas de 250 µl. Las muestras se almacenaron a -70° C para su posterior uso. Se preparó el marcador de corrido, con 1 ml de buffer de extracción y una traza de azul de bromofenol.

Para la preparación de geles se utilizaron los protocolos reportados por Bhat y Lakhanpaul (1995) (Cuadros 2a y 2b). Dos sistemas de buffer de corrido (I y II) fueron utilizados, dependiendo de las enzimas probadas (Cuadro 3). El sistema de buffer I (Tris-

**CUADRO 2a.** Mezclas de polimerización empleadas en la preparación de geles de poliacrilamida (16x20x1,5 cm). Basado en Bhat y Lankhanpaul, 1995.

<b>Separador</b>	7,7 %	Solución A	16 ml
		Solución B	32 ml
		H <sub>2</sub> O	16 ml
		Solución D	64 ml
		Solución E	40 ml
<b>Concentrador</b>	4,6 %	Solución A	5 ml
		Solución C	10 ml
		H <sub>2</sub> O	5 ml
		Solución D	20 ml

**CUADRO 2b.** Soluciones madre para la preparación de geles de acrilamida. Basado en Bhat y Lakhandpaul, 1995.

SOLUCION	COMPONENTES	CANTIDAD PARA 100 ml
A.	HCl IN Trizma TEMED	48,0 ml 36,6 gr 0,46 ml
B.	Acrilamida Bis	30,0 gr 0,8 gr
C.	Acrilamida Bis	100,0 gr 0,47 gr
D.	Persulfato de amonio	0,14 gr
E.	Glicerol	50,0 ml

**CUADRO 3.** Sistemas de buffer de corrida para electroforesis de isoenzimas en clones de la CCM.

Sistema	Enzima	Buffer gel concentrador	Buffer gel separador	Buffer de corrida	Condicion de corrido
I*	GDH	Tris HCl 0,375 M pH 8,9	Tris HCl 0,375 M pH 8,9	Tris 0,02 M Glicina 0,19 M pH 8,8	70V - 60' 200V -Final
II**	DIA ME PGI PGDH RUB	Tris HCl 0,5 M pH 6,8	Tris HCl 1,5 M pH 8,8	Tris 0,06 M Ac.bórico 0,017M pH 8,8	50V - 15' 100V - 15' 150V - 30' 200V - 15' 250V - final

\* Basado en Bhat and Lakhanpaul, 1995 \*\* Basado en Hussain *et al*, 1986

**CUADRO 4.** Protocolos de tinción para seis sistemas isoenzimáticos en clones de LA CCM.

**DIAFORASA (DIA)**

Tris HCl 1M pH 8,5	10 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml
B -NAD	0,08 gr
2,6-Dicloro fenol indofenol	Traza
MTT	0,03 gr

Disolver el sustrato y la sal de coloración en el buffer e incubar en oscuridad por cuatro horas a temperatura ambiente.

**GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH)**

Tris HCl 0.1 M pH 7,5	100 ml
Glutamato 1 M pH 7,0	5 ml
B - NAD	0,035 gr
MTT	0,015 gr
PMS	0,01 gr

Mezclar , incubar por cuatro horas a 37 °C.

**ENZIMA MALICA (ME)**

Tris malato 0.1 M pH 7,2	90 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	10 ml
B - NADP	0,02 gr
MTT	0,06 gr
PMS	0,01 gr
L-malato	0,04 gr

Mezclar e incubar durante 45 minutos, a 37 °C .

**CUADRO 4.** (Continuación) Protocolos de tinción para seis sistemas isoenzimáticos en clones de LA CCM.

#### **FOSFOGLUCO ISOMERASA (PGI)**

Tris HCl 0.1 M pH 8,0	10 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml
MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	2 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	50 unidades
B-NADP	0,02 gr
MTT	0,015 gr
PMS	0,01 gr

Mezclar, incubar a 37 ° C durante cuatro horas.

#### **FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (PGDH)**

Tris malato 0,1 M pH 7,2	100 ml
Acido fosfogluconico	0,025 gr
B-NADP	0,02 gr
MTT	0,02 gr
PMS	0,01 gr

Mezclar, incubar a 37 ° C durante tres horas.

#### **RUBISCO (RUB)**

Azul negro de naftol	0,1 gr
Solución de lavado:	
Metanol	100 ml
H <sub>2</sub> O	100 ml
Ac. Acético	20 ml

Disolver el azul negro de naftol en 100 ml de solución de lavado y filtrar, agregar la mezcla al gel y dejar en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente, después, lavar repetidas veces con la solución de lavado, dejando en agitación hasta que el gel tome un color azul claro.

glicina, pH 8,8), el cual está basado en la metodología reportada por Bhat y Lakhanpaul (1995), permitió buena resolución para la enzima GDH. El sistema II (Tris-ácido bórico, pH 8,8), fundamentado en los protocolos propuestos por Hussain *et al.* (1986), permitió la resolución de las enzimas PGDH, RUB, DIA, ME, y PGI.

Los geles fueron llevados a una cámara de electroforesis PROTEAN II y mantenidos a corriente constante (Fuente de poder BIORAD modelo 500), de acuerdo con el programa descrito en el cuadro 3. Para el revelado de las bandas, los geles fueron tincionados histoquímicamente, según los protocolos descritos en otras especies por Shawn y Prasad (1970), Stuber *et al.* (1988), Soltis *et al.* (1983) y Vallejos (1983) con algunas modificaciones (Cuadro 4).

Después de incubados, los geles se lavaron y fijaron en una solución compuesta por ácido acético glacial, metanol y agua (1:6:14). Los patrones de bandas fueron interpretados visualmente y fotografiados. Posteriormente los geles fueron deshidratados con una solución de etanol, glicerol y agua (50:1:49) y guardados en bolsas plásticas debidamente identificadas.

### Análisis de Zimogramas

Una vez fijados los geles, estos se sometieron a interpretación, determinando las zonas de actividad (loci) y el número de bandas por locus (alelos) para las enzimas probadas. Al locus más anodal se le denominó 1, al siguiente 2 y así sucesivamente; en cada locus, la aloenzima que migró más rápidamente fue denominada a, la siguiente b, y así sucesivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de tejido foliar joven de clones micropropagados bajo condiciones *in vitro*, se probaron 23 sistemas isoenzimáticos. De 11 sistemas con actividad electroforética, seis reportan variaciones con respecto a estudios anteriores. Las enzimas DIA y RUB se reportan por primera vez para el género *Musa*. Diaforasa presentó un alto grado de

polimorfismo, mientras que Rubisco mostró monomorfismo en los clones de plátano y banano estudiados. Cuatro enzimas: ME, GDH, PGDH Y PGI se reportan por primera vez en geles de acrilamida. A continuación, se analiza y propone el patrón de comportamiento de estas enzimas.

**Diaforasa (DIA):** Esta isoenzima presentó cuatro zonas de actividad con 10 alelos distribuidos en el material estudiado. La zona más anódica, DIA-1, mostró un patrón monomórfico de doble banda para todos los clones probados. Las zonas DIA-2 y DIA-3, presentaron cuatro alelos cada una. La presencia de doble banda en los individuos híbridos hace suponer una estructura monomérica de la enzima. El área más catódica DIA-4, permitió inferir la presencia de al menos dos alelos distribuidos en los materiales bajo estudio, en condición monomérica (Fig.1).

Hallazgos similares, tanto en el número de zonas de actividad, como del polimorfismo dentro de loci, se han reportado para especies como frijol (Koenig y Gepts, 1989) y yuca (Giraldo, 1996). Esta enzima ha sido considerada por muchos autores como una excelente candidata para ser utilizada en la identificación clonal, por sus claros bandeos y la alta repetibilidad de sus patrones (Giraldo, 1996; Roca *et al.*, 1993; Koenig y Gepts, 1989; Kiang y Gorman, 1983).

**Rubisco (RUB):** Este sistema se reportó por primera vez para el género *Musa*. Se encontró una zona de actividad: Rub-1, bastante catodal. Se expresó en forma monomórfica con una sola banda para todos los clones evaluados (Figura 1). Se alcanzaron a visualizar otras bandas, pero el revelado fue muy tenue, impidiendo interpretar, de manera confiable, el patrón enzimático. Este sistema ha sido probado en otras especies, como el frijol, obteniendo resultados similares (Hussain *et al.*, 1986).

**Enzima Málica (ME):** El corrimiento de este sistema es nuevo en acrilamida para clones de *Musa*. Se observaron dos zonas de actividad en los geles: ME-1 presentó dos variantes con una y tres bandas para los

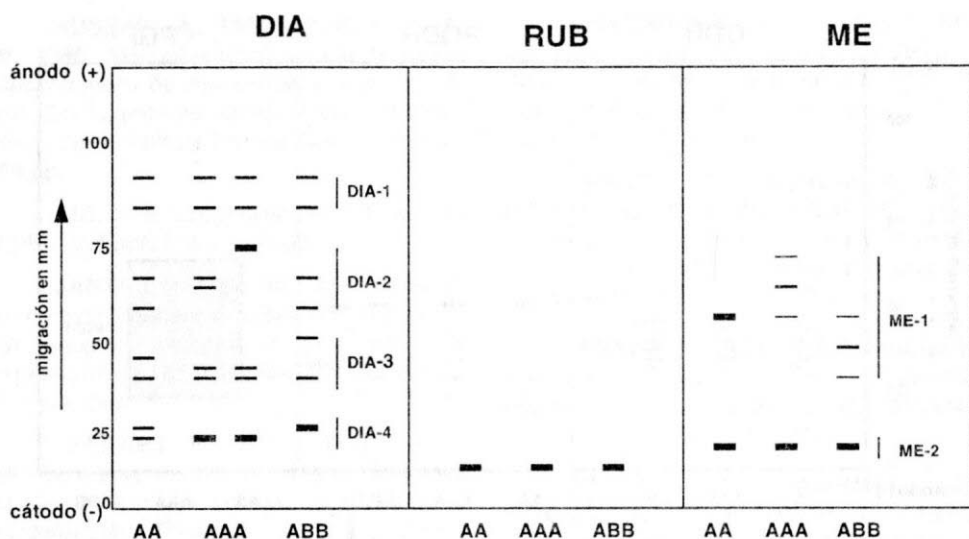


FIGURA 1. Zimograma para los sistemas DIA, RUB y ME en clones de la CCM. Migración anodal para todas las enzimas.

homodímeros y heterodímeros, respectivamente; ME-2 mostró solo una banda monomórfica en todos los clones estudiados (Figura 1). Jarret y Litz (1986 b) reportan la aparición de esta banda en el género, con una amplia actividad en geles de almidón. En yuca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz), se describen dos zonas de migración, coincidiendo en el patrón de la zona más catódica ME-2 que presentó la misma banda (Giraldo, 1996).

#### Glutamato Deshidrogenasa (GDH):

Esta isoenzima se reporta por primera vez en acrilamida. La actividad de la enzima se observó en grupos de aproximadamente siete bandas (Figura 2), en contraste con lo señalado por Jarret y Litz (1986 b) en geles de almidón que revelaron un triplete de bandas. De estos resultados se puede inferir que la diferencia de patrones pudo ser causada por el sistema electroforético empleado para la separación de la enzima, ya que cualquier cambio en el corrimiento es motivo de alteración en el patrón de bandeado (Keparth, 1990).

#### Fosfogluconato Deshidrogenasa (PGDH):

Esta isoenzima reveló dos áreas de actividad en los geles de poli-acrilamida y es la primera vez que se reporta en este tipo de

matriz. En la zona PGDH-1, se observó una banda en forma monomórfica para todos los clones; PGDH-2 mostró su naturaleza dimérica evidente con tres bandas para el genotipo heterocigoto (Figura 2). Estos resultados están de acuerdo con lo presentado por Jarret y Litz (1986) en *Musa*, quienes indican la aparición de las tres bandas en la zona catódica PGDH-2, sugiriendo la heterocigocidad de un locus simple. Resultados similares para otras especies como maíz (*Zea mays* L.) han sido consignados por Goodman *et al* (1983).

#### Fosfoglucoisomerasa (PGI):

Esta es la primera vez que se expresa esta isoenzima en acrilamida. Reveló una zona de actividad negativa y muy tenue (Figura 2). La razón pudo ser el sistema de coloración empleado, basado en tetrazolium, el cual incluye MTT y PMS que son sales que se fotoreducen y se puede velar con mucha facilidad la tinción, porque se inhibe la formación del cromóforo que revelaría en el sitio de actividad de la enzima, dejando un "Background" o sombra fantasma difusa en su lugar (Vallejos, 1983). En contraste con el análisis de Jarret y Litz (1986 b) y Lebot *et al* (1993), en corrimientos hechos en almidón, se observó un triplete de bandas, sugiriendo la estructura dimérica.



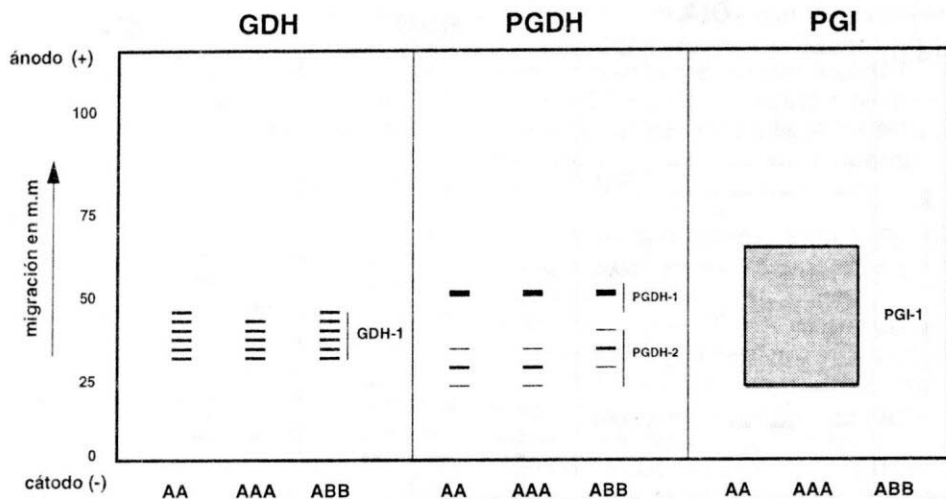


FIGURA 2. Zimograma para las enzimas GDH,PGDH y PGI en clones de la CCM. Migración anodal para todas la enzimas.

Para la caracterización bioquímica de la Colección Colombiana de Musáceas, se sugiere la utilización de las enzimas, DIA, ME, GDH, PGDH y PGI, y en especial la enzima DIA (diaforasa) por el alto nivel de polimorfismo encontrado durante este estudio.

## BIBLIOGRAFIA

**BHAT, K. y LAKHANPAUL, S.** 1995. Study of polymorphism. *In: Plant germoplasm conservation: Biochemical Approaches*. Rana et al (eds). NBGPR, New Delhi, 243-250.

**BHAT, K., BHAT, S. y CHANDEL, P.** 1992a. Survey of isoenzyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. I. Esterase, acid phosphatase and catalase. *Amer. J. Hort. Sci.* 67:501-507.

**BHAT, K., BHAT, S. y CHANDEL, P.** 1992b. Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. II: Peroxidase, superoxide dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase. *Amer. J. Hort. Sci.* 67:737-743.

**BONNER, J., WARNER, R. y BREWBAKER, J.** 1974. A chemosystematic study of *Musa* cultivars. *HortScience* 9:325-328.

**BONNER, J.** 1990. Identification of genetic diversity in the genus *Musa*: a general introduction. *In: Workshop on identification of genetic diversity in genus Musa*. (1988: Los Baños). Proceedings, Montpellier, Francia. INIBAP.

**ESPINO, R. y PIMENTEL, R.** 1990. Electrophoretic analysis of selected isoenzymes in BB cultivars of Philippine bananas. *In: Workshop on identification of genetic diversity on genus Musa*. (1988. Los Baños). Proceedings, Montpellier, Francia. INIBAP. 87-96.

**GIRALDO, M.** 1996. Contribución al entendimiento de la diversidad genética en clones tradicionales de yuca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz) en Colombia. Tesis de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia. 103 pp.

**GOODMAN, M. y STUBER, C.** 1983. Maize. *In: Isozymes and Plant Genetics and Breeding*. S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 1-33.

**HORRY, J.** 1989. Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*. *Fruits*. 44: 455-475.

- HUSSAIN, A., RAMIREZ, H. y ROCA, W.** 1986. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. Documento de trabajo. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Colombia .53 pp.
- IUB.** 1978. Enzyme nomenclature. New York: Academic Press. 606 pp.
- JARRET, R.** 1990. Molecular methods for detecting genetic diversity in *Musa*. In: Workshop on identification of genetic diversity in genus *Musa*. (1988, Los Baños). Montpellier, Francia. INIBAP. 56-66.
- JARRET, R.** 1987. Biochemical genetic markers and their uses in the genus *Musa*. In: Banana and plantain breeding strategies (eds Presley, G and De Langhe, E.) Australia 21.
- JARRET, R. y LITZ, R.** 1986a. Isozymes and allelic diversity in the genus *Musa*. FAO/IBPRG Plant Genetic Newsletter. 70: 20-23.
- JARRET, R. y LITZ, R.** 1986 b. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35:539-550.
- JARRET, R. y LITZ, R.** 1986 c. Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* colla J. *Heredity* 77:183-186.
- KEPHART, S.** 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Botany* 77: 693-712.
- KIANG, Y. y GORMAN, M.** 1983. Soybean. In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. S.D. Tanksley and T.J.Orton, (eds.). Elsevier, Amsterdam. p 469-516.
- KOENIG, C. y GEPTS, P.** 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theo. Appl. Genet.* 78: 809-817.
- KRIKORIAN, A.** 1990. Medios de cultivos: Generalidades, composición y preparación. In: Cultivo de tejidos en la agricultura tropical. W. Roca, y L. Mroginski, (Eds.). Cali, Colombia, CIAT 225-247.
- LEBOT, V., ARADHYA, K., MANSHARD, R. y MEILLEUR, B.** 1993. Genetic relationships among cultivated bananas and plantains from Asia and the Pacific. *Euphytica* 67: 163- 175.
- ROCA, W., MAYER, J., CORRALES P. y TOHME, J.** 1993. Proceedings *Phaseolus* beans advanced biotechnology research network. CIAT, Cali, Colombia.
- STUBER, C., WENDEL, J., GOODMAN, M. y SMITH, J.** 1988. Techniques and scoring products for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical bulletin 286. North Carolina State University, Raleigh. NC. 87 p.
- SHAW, C. y PRASAD, R.** 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics* 4:297-320.
- SOLTIS, D., HAUFLE, C., DARROW, D. y GASTINI, G.** 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation or grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73:9-27.
- TANKSLEY, S. y RICK, C.** 1980. Isozymic linkage map of tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57: 161-170.
- TANKSLEY, S. y ORTON, T.** 1983. Isozymes and Plant Genetics and Breeding. Part B. Elsevier Science Publishers, B. V.
- VALLEJOS, E.** 1983. Enzyme activity staining. In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. S.D. Tanksley and T.J.Orton, Eds. Elsevier, Amsterdam. pp 469-516.