

OBTENCION DE SOMACLONES DE CAÑA DE AZUCAR DE ALTO RENDIMIENTO AGRICOLA MEDIANTE EL CULTIVO DE TEJIDOS

R.H. Maribona, S.B. Korneva, O. Coto, P. Díaz, A. Ruiz, O. Oliva, H. Jorge,*
E. Héctor,* P.P. Acosta,** E. Acosta** y E. Pedraza.**

Departamento de Mejoramiento de las Plantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, *Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar y **Ministerio de la Industria Azucarera, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de agosto de 1993.

RESUMEN. Vitroplántulas de caña de azúcar, obtenidas a partir de la variedad C 87-51 fueron sometidas a un proceso de selección que incluyó evaluaciones de campo y de laboratorio de caracteres agrozucareros y fitopatológicos, así como la aplicación de técnicas bio químicas para confirmar la aparición de variaciones genéticas de interés. Esto permitió seleccionar un grupo de diez somaclones que presentaban un comportamiento destacado en los estudios realizados durante el lote de postura y clonal. Los experimentos regionales mostraron incrementos de los rendimientos de los somaclones entre un 15 y 30 % con respecto al donante. El análisis de la estabilidad realizado según el método de la Ecovalencia (W) para las dos localidades estudiadas (Matanzas y Cienfuegos) y para las dos cepas evaluadas (caña planta y primer retoño) confirmó las destacadas características del somaclón CC 105-82. La respuesta fitopatológica de los tres somaclones más destacados (CC 105-82, CC 43-82 y CC 12-82) frente a la roya, el carbón de la caña de azúcar y el VMCA, es similar a la de la C 87-51. Esto permitió recomendar la liberación final del somaclón CC 105-82 para su explotación comercial, ocupando hasta el presente, los tres genotipos anteriores un total de 1 110 ha .

ABSTRACT. *Vitro sugarcane plants, obtained from the C 87-51 variety were submitted to a selection program, which enclosed laboratory and fields trials for measuring the agricultural and phytopathological behavior and also the sugar content. On the other hand, the use of biochemical techniques permitted to confirm the occurrence of interesting genetic variations. A set of ten somaclones, which presented an outstanding behavior during the seedling and the clonal phases were selected. The location field trials, showed an increase in the yields of the somaclones from 15 to 30 % in relation to the donor variety. The stability analysis by the Ecovalence method in the studied environments permitted to confirm the outstanding performance of the CC 105-82 somaclon. The sugar cane majors diseases test showed resistance characteristics of three genotypes (CC 105-82, CC 43-82 and CC 12-82), similar to the donor plant. These outstanding results permitted to recommend the final release of somaclones for commercial use. At the present time, high yielding somaclones are planted in 1 100 ha of commercial blocks.*

INTRODUCCION

En la década de los 70s, un grupo de investigadores de varios países, de forma independiente, reportaron la inducción de variabilidad en las plantas de caña neoformadas obtenidas por cultivo de tejidos.¹⁻⁴ Sin embargo, no es hasta mediados de la década de los años 80, que finalmente se acepta un nuevo concepto en la genética vegetal, la variación somaclonal.⁵ Es decir, la variación genética inducida por el cultivo de células y tejidos.

Los trabajos de cultivo de tejidos de la caña de azúcar se iniciaron en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas en 1980, aún en pleno escepticismo sobre la variabilidad genética inducida por esta tecnología y que aún está presente debido a que es considerada como una fuente no real de variabilidad genética y muchos autores catalogan al proceso cultivo-regeneración y pesquisaje como una empresa desesperada o sea un recurso último.⁶

Estas investigaciones cobraron rápidamente un sentido práctico: obtener una variedad mejorada por cultivo de tejidos, y para ello, fue conformado un programa de trabajo cuyos objetivos fueron los siguientes: demostrar que el cultivo de tejidos es capaz de inducir variabilidad genética de utilidad y genéticamente estable y que la mejora de un carácter es posible sin variar el resto de los caracteres útiles de la planta, al obtener somaclones de caña de caña de azúcar a partir de la variedad C 87-51 con mayor rendimiento agrícola.

MATERIALES Y METODOS

Los explantes fueron tomados de segmentos del vástago apical, domo meristemático apical de plantas de caña de azúcar y sembrados en medio MS,⁷ modificado según Korneva,⁸ en sus concentraciones de auxinas, kinetina y arginina en el medio de cultivo para la obtención de callos.

Los subcultivos mensuales se realizaron en la oscuridad siendo regenerado en un recipiente de 4ha2 500l ux y 10h de oscuridad en ausencia de 2,4 D, a (25 ± 2) °C.

Las plántulas diferenciadas, después de cuatro a seis semanas de cultivo a la luz, fueron trasplantadas a bolsas que contenían una mezcla de suelo ferralítico rojo, cachaza curada y arena de río en relación 2:1:1 y colocadas en casa de cristal urante2a4s emanasp aras ua daptación.

Lote de posturas

Las 728 plántulas obtenidas, fueron plantadas en un suelo ferralítico rojo en julio de 1983, en condiciones de secano y fertilización total. En el campo se distribuyeron en un bloque de 40su rcos a 20pl antas por surco. Los testigos utilizados (C 87-51 como variedad donante y la Ja 60-5 como patrón de rendimiento) fueron plantados de acuerdo con la metodología propuesta por López y col.⁹ para el lote de posturas y sometidas a un proceso de selección sobre la base de la evaluación en caña planta a los 12 meses de edad y en

primer retoño a los 18 meses de edad de los caracteres siguientes:

Caracteres agrobotánicos

Velocidad y germinación (%)
Color del tallo
Número de tallos molibles por metro
Hábito de crecimiento
Diámetro del tallo (cm)
Altura del tallo (m)
Despaje
Hijos aéreos

Caracteres agroindustriales

Brix refractométrico corregido
Tonelada de caña por hectárea ($t_{caña}/ha$)
Pureza
Tonelada de pol por hectárea (t_{pol}/ha)
Fibra
%d ep ol.

Caracteres bioquímicos

Durante la fase de estudios clonales fueron realizadas evaluaciones bioquímicas que incluyeron análisis de isoenzimas peroxidasa, esterasa y malato dehidrogenasas, así como fue realizado el isoelectroenfoque de las proteínas totales de acuerdo con las metodologías propuestas por varios autores.⁹⁻¹⁵

Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en los estudios clonales y regionales fue de bloques al azar, con cinco réplicas. Las parcelas fueron de tres surcos de 7,5 m de cada uno de los individuos estudiados, durante dos cepas (caña planta y primer retoño) y en dos localidades. Las normas fitotécnicas aplicadas fueron las recomendadas para cada caso por López y colaboradores.¹⁶

Tratamiento estadístico

Los datos experimentales de los caracteres cuantitativos fueron procesados a través de un análisis de varianza múltiple, modelo de bloques al azar para constatar las diferencias entre los genotipos en cada cepa y en cada localidad, de acuerdo al método propuesto por Shaeffe.¹⁷ Las medias en los casos necesarios fueron comparadas a través del test de Rangos Múltiples dED uncanp arap<0, 001. Para la análisis de Estabilidad de las variables estudiadas se utilizó el método de la Ecovalencia (W) propuesto por Wricke.¹⁸

Comportamiento fitosanitario

Los somaclones finalmente seleccionados se sometieron a la prueba estatal de enfermedades mayores donde se evaluaron por su comportamiento ante la roya, el carbón de la caña de azúcar y el VMCA durante dos cepas (caña planta y primer retoño).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variaciones agrobotánicas: selección del lote de posturas

El efecto que ejerce el cultivo *in vitro* en la aparición de variaciones morfológicas en la caña de azúcar no es un fenómeno nuevo, estas variaciones por lo general, son de dos tipos fundamentalmente, aquellas variaciones groseras como el enanismo, albinismo y otras que provocan la muerte de la planta y las pequeñas variaciones que no llegan a producir afectaciones fisiológicas o epigenéticas.

De los 728 somaclones fueron seleccionados 110 que representaron el 5% de la población, teniendo en cuenta u

vigor fundamentalmente, éstos presentaban variaciones en el color y número de tallos, forma de la yema, forma y color del anillo de crecimiento y color de la vaina, siendo estos resultados similares a los reportados por Heinz y Mee¹⁹ y Frías y colaboradores.²⁰

Se observaron además, otros tipos de variaciones, indeseables desde el punto de vista comercial, las cuales han sido descritas por Maribona y col.²¹ En su conjunto tanto las variaciones fenológicas útiles como indeseables, totalizaron un 18 % de la población.

Variaciones bioquímicas

El empleo de las técnicas isoenzimáticas ha solucionado problemas inherentes a la identificación de clones de especies vegetales. En este caso, el análisis de las peroxidases de los 110 somaclones seleccionados mostró, sin embargo, un porcentaje muy reducido de variabilidad. La realización de los restantes caracteres bioquímicos evaluados fue satisfactoria, alcanzando las variaciones en los electroforegramas un orden porcentual (Tabla I).

TABLA I
Resultados de los análisis isoenzimáticos

| Isoenzima | Diferentes | % |
|-------------|------------|------|
| Peroxidases | 1 | 0,9 |
| Esterasas | 14 | 12,7 |
| MDH | 15 | 13,6 |

MDH malato deshidrogenasas.

El análisis de las proteínas totales foliares por electroforesis y electrofocalización arrojó que los 200 maclones diferentes por isoenzimas poseían patrones de proteínas distintos. Estos resultados confirman una vez más, la potencialidad de los expectros enzimológicos como marcadores isoenzimáticos en la identificación genética de genotipos de caña de azúcar y están en correspondencia con los alcanzados por Heinz y Mee¹⁸ y Frías.¹⁹

Variaciones agroazucareras

La teoría esgrimida por muchos investigadores de que las variaciones detectadas en poblaciones de somaclones tienen un origen epigenético ha conspirado hasta el presente contra la utilización del cultivo de tejidos como vía alternativa del mejoramiento genético, limitando la ocurrencia de fenómenos genéticos tales como mutaciones y delecciones a los marcos del cruzamiento sexual. Sin embargo, en caña de azúcar no han sido pocos los intentos por romper dichas limitaciones y como ejemplo se encuentran los trabajos de Heinz¹ para mejorar la resistencia a la mancha de ojo y los de Krishnamurthi y Tlaskal² quienes obtuvieron subclones resistentes a partir de clones susceptibles a la enfermedad de Fiji y al mildiu lanoso. Asimismo, Ploper y col.²² lograron obtener un grupo de somaclones de la variedad NA 56-79 que presentaban un comportamiento azucarero alterado.

De todos estos casos el estadio más alto alcanzado por estos individuos ha sido una etapa de explotación precomercial y entre ellos, los revertantes han estado presente con relativa frecuencia.

Toneladas de caña por hectárea

El análisis de varianza realizado para las variables agroazucareras mostró para el carácter $t_{caña}/ha$, diferencias significativas entre los genotipos, localidades y cepas estudiadas, no así para las interacciones (Tabla II).

TABLA II
Análisis de varianza

| F. de variación | t _{caña/ha} | Cuadrados medios t _{pol/ha} | % pol caña |
|-----------------|----------------------|--------------------------------------|------------|
| G | 595,438** | 8,17* | 0,45 ns |
| L | 2820,5** | 12,19 ns | 164,54*** |
| C | 1513,25* | 354,22*** | 521,78*** |
| G x L | 144,148 ns | 3,19 ns | 0,36 ns |
| G x C | 303,335 ns | 5,33 ns | 0,44 ns |
| L x C | 293,375 ns | 11,6 ns | 58,03*** |
| GxLxC | 212,449 ns | 5,08 ns | 0,85** |
| Error | 184,385 | 3,22 | 0,29 |

* significativo para $p < 0,05$; ** muy significativo para $p < 0,01$.

*** altamente significativo para $p < 0,001$; ns no significativo.

G genotipo; L localidad; C cepas.

El análisis de los genotipos mostró que sólo existen diferencias significativas ($P\%$) entre la Ja 60-5 y el somaclón CC 59-82, sin embargo, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los somaclones y el donante C 87-51, se apreció que todos ellos presentaron un rendimiento superior para este carácter (Tabla III).

TABLA III
Medias de los genotipos, localidades y cepas para las toneladas de caña por hectárea

| Genotipos | \bar{X} |
|---------------------|--------------|
| Ja 60-5 | 77,07 a |
| C 87-51 | 51,54 ab |
| CC 12-82 | 61,49 ab |
| CC 43-82 | 63,75 ab |
| CC 59-82 | 48,93 b |
| CC 64-82 | 55,27 ab |
| CC 71-82 | 58,39 ab |
| CC 87-82 | 61,73 ab |
| CC 94-82 | 63,48 ab |
| CC 98-82 | 62,36 ab |
| CC 99-82 | 60,40 ab |
| CC 105-82 | 60,62 ab |
| Localidad | |
| Matanzas | 64,84 a |
| Cienfuegos | 55,99 b |
| Cepas | |
| Caña Planta | 63,66 a |
| Primer retoño | 57,18 b |
| X _G ± ES | 60,42 ± 7,84 |
| CV | 22,47 |

a-b Medias con letras no coincidentes, difieren entre sí, según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

X_G Media general del carácter.

ES Error estándar. CV Coeficiente de variación (%).

Además, los resultados del análisis de las localidades y las cepas (Tabla III), permitieron encontrar diferencias significativas para ambos caracteres, correspondiendo el mayor valor de media a Matanzas. En cuanto a las cepas, se obser-

varon también diferencias significativas, siendo superiores los rendimientos durante la caña planta.

Los valores de Ecovalencia determinados para este carácter muestran que sólo el somaclón CC 98-82 difiere significativamente del donante y se considera además, como individuo inestable; por otra parte, solo el somaclón CC 105-82 supera en estabilidad a la C 87-51 mientras que los restantes genotipos presentan valores de estabilidad inferiores aunque sin que estas diferencias sean significativas (Tabla IV). Estos resultados avalan la estabilidad del somaclón CC 105-82.

TABLA IV
Valores de Ecovalencia de los genotipos

| Genotipo | Eco | va | le | nc | ia |
|----------|----------------------|---------------------|------------|----|----|
| | t _{caña/ha} | t _{pol/ha} | % pol caña | | |
| Ja 60-5 | 124,81 ab | 2,58 abcd | 0,2524 bcd | | |
| C 87-51 | 461,85 b | 5,13 bcd | 0,2808 bcd | | |
| CC 12-82 | 77,24 ab | 0,86 abc | 0,7457 bcd | | |
| CC 43-82 | 357,41 ab | 3,34 abcd | 0,1803 bc | | |
| CC 59-82 | 69,87 ab | 1,33 abcd | 1,0372 cd | | |
| CC 64-82 | 205,5 ab | 9,44 cd | 0,2458 bcd | | |
| CC 71-82 | 83,53 ab | 2,51 abcd | 0,3291 bcd | | |
| CC 87-82 | 81,03 ab | 0,81 ab | 0,3182 bcd | | |
| CC 94-82 | 153,232 ab | 0,72 ab | 0,3419 bcd | | |
| CC 98-82 | 35,68 a | 0,43 a | 0,0130 a | | |
| CC 99-82 | 198,19 ab | 2,89 abcd | 0,0769 ab | | |
| CC105-82 | 476,119 bb | 12,19 d | 2,2116 d | | |

a-b Medias con letras no coincidentes, difieren entre sí, según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

Toneladas de pol por hectárea

Para el carácter t_{pol/ha}, sólo entre los genotipos y las cepas existen diferencias significativas (Tabla II).

Para este mismo carácter, se observa (Tabla VI) que sólo el individuo CC 64-82 presenta una media inferior a la C 87-51, el resto de los individuos presentan valores superiores al donante.

En cuanto a las cepas, se reportan diferencias significativas correspondiendo el mayor valor al primer retoño (Tabla VI).

El análisis de la Ecovalencia (W) para las toneladas de pol por hectárea, solamente los somaclones CC 105-82 y CC 64-82 superan al donante en estabilidad, pero sin que se encontraran diferencias significativas con respecto a él, los restantes somaclones en estudio presentan valores de W inferiores correspondiendo al somaclón CC 98-82 el valor más bajo y es por ello, el más inestable (Tabla IV).

Porcentaje de pol en caña

Para el porcentaje de pol en caña se encontraron diferencias significativas entre las localidades (L), cepas (C) e interacciones LxC y GxLxC (Tabla II).

En la Tabla V puede observarse que los valores mayores para este carácter corresponden a la caña planta de Cienfuegos, asimismo, se observa de forma general, un comportamiento similar de los somaclones con respecto al donante, en este sentido, en la localidad de Matanzas en la cepa de

caña planta sólo los genotipos CC 105-82 y CC 71-82 superan a la C 87-51, aunque dichos aumentos no fueron significativos, sin embargo, al analizar el primer retoño en esta lo-

calidad, se observa que todos los individuos presentan valores de media superiores a la C 87-51, excepto los somaclones CC 105-82 y CC 94-82.

TABLA V
Medias de los genotipos para el porcentaje de pol en caña

| | L ₁ C ₁ | L ₁ C ₂ | L ₂ C ₁ | L ₂ C ₂ |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ja 60-5 | 18,88 a | 14,48 abcde | 20,15 a | 17,41 abc |
| C 87-51 | 19,66 a | 13,92 de | 20,23 a | 17,96 a |
| CC 12-82 | 19,57 a | 15,43 abcde | 20,64 a | 17,7 ab |
| CC 43-82 | 19,28 a | 14,16 cde | 20,52 a | 18,05 a |
| CC 59-82 | 19,05 a | 15,37 abcde | 20,48 a | 17,79 a |
| CC 64-82 | 19,58 a | 14,17 cde | 20,18 a | 17,22 abcd |
| CC 71-82 | 19,7 a | 14,38 bcde | 19,85 a | 17,99 a |
| CC 87-82 | 19,4 a | 14,79 abcde | 20,5 a | 17,44 abc |
| CC 94-82 | 19,39 a | 13,6 e | 20,18 a | 17,69 ab |
| CC 98-82 | 19,4 a | 14,42 bcde | 20,23 a | 17,81 a |
| CC 99-82 | 19,54 a | 14,7 abcde | 20,41 a | 18,18 a |
| CC 105-82 | 19,85 a | 12,94 e | 20,42 a | 18,09 a |
| $\bar{X}_G \pm ES$ | 17 ± 0,311 | | | |
| CV | 3,01 | | | |

a-b Medias con letras no coincidentes, difieren entre sí, según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

L₁C₁ Matanzas caña planta; L₂C₁ Cienfuegos caña planta; L₁C₂ Matanzas primer retoño

L₂C₂ Cienfuegos primer retoño; X_G Media general del carácter; ES Error estándar.

CV Coeficiente de variación (%).

Similares resultados se obtuvieron en la localidad Cienfuegos, donde los somaclones CC 12-82, CC 43-82, CC 59-82, CC 99-82 y CC 105-82 superan aunque sin diferencias significativas al donante en caña planta, estos aumentos fueron mantenidos durante el primer retoño por los cuatro últimos somaclones. De forma general, el donante y los somaclones aventajaron al testigo de rendimiento en los ambientes estudiados (Tabla V).

Para el % de pol en caña, el somaclón CC 105-82 supera a los restantes individuos incluido el donante aunque las diferencias no son significativas, el somaclón CC 98-82 continua mostrándose como el más inestable unido al CC 99-82 para esta variable.

El resto de los genotipos en estudio presenta una estabilidad similar para este carácter (Tabla VI).

Comportamiento ante las enfermedades mayores

El surgimiento de variaciones genéticas indeseables es un aspecto que limita el éxito del mejoramiento a través del cultivo de tejidos, debido a que la posibilidad real de afectar negativamente parámetros agroazucareros y fitopatológicos en las poblaciones obtenidas.

El comportamiento de los genotipos en la Prueba Estatal de enfermedades mayores realizada entre 1988-1990, permitió recomendar y liberar finalmente, a los somaclones CC 105-82, CC 12-82 y CC 43-82, como aptos para su explotación comercial, al mostrar un comportamiento ante las principales enfermedades que atacan a la caña de azúcar acorde a los niveles permisibles para el donante.

TABLA VI
Medias de los genotipos y las cepas para las toneladas de pol por hectárea

| Genotipos | \bar{X} |
|--------------------|--------------|
| Ja 60-5 | 12,41 a |
| C 87-51 | 10,5 ab |
| CC 12-82 | 12,14 ab |
| CC 43-82 | 11,71 ab |
| CC 59-82 | 10,13 ab |
| CC 64-82 | 9,78 b |
| CC 71-82 | 10,95 ab |
| CC 87-82 | 11,73 ab |
| CC 94-82 | 11,81 ab |
| CC 98-82 | 11,41 ab |
| CC 99-82 | 11,16 ab |
| CC105-82 | 11,98 ab |
| <hr/> | |
| Cepas | |
| Caña planta | 9,74 b |
| Primer retoño | 12,88 a |
| $\bar{X}_G \pm ES$ | 11,31 ± 1,04 |
| CV | 15,87 |

a-b Medias con letras no coincidentes, difieren entre sí, según prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$). X_G Media general del carácter. ES Error estándar. CV Coeficiente de variación (%).

CONCLUSIONES

El cultivo de tejidos es capaz de inducir variabilidad genética útil en la caña de azúcar.

El aumento del rendimiento agrícola de los somaclones, no ha alterado otros caracteres que definen el alto valor comercial del donante, la variedad C87-51.

El carácter de alto rendimiento agrícola inducido por el cultivo de tejidos en los somaclones, ha mostrado valores de estabilidad confiables para su explotación comercial.

La fijación de los nuevos caracteres agromorfobioquímicos de los somaclones a través de varias generaciones y propagaciones en distintos ambientes, definen su existencia como nuevos genotipos.

BIBLIOGRAFIA

1. Heinz D.J. FAO/IAEA Panel Proc. Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants. PL 501/5, 53-59, 1973.
2. Krishnamurthi M. and Tlaskal J. Proc. Intern. Soc. Sugar cane Technologists Vol. XV, 130-137, 1974.
3. Hendre R.R., Mascarenhas A.F. Nadgir A.L., Mura P. and Jagannathan V. **Indian Phytopathology**, **28**, 2, 175-178, 1975.
4. Liu M.C. and Chen W.H. **Euphytica**, **27**, 273-282, 1978.
5. Larkin P.J. and Scowcroft W.R. **Theoretical and Applied Genetic**, **60**, 197, 1981.
6. Scowcroft W. CIBA Foundation Symp. on Applications of Plant Cell and Tissue Culture, 269, John and Sons Ltd., U.K., 1988.
7. Murashige T. and Skoog F. **Physiologia Plantarum**. **15**, 473, 1962.
8. Korneva S.B. Solicitud de Patente RPI 227-91, ONIITEM, Cuba.
9. Maribona R.H., Korneva S.B., Ruíz A. and Gonzalez S., Proc. XVIII ISSCT Congress (Biological Commission), 55, 1984.
10. Héctor E., Maribona R.H., Ruíz A. y Vega A. **Revista CENIC Ciencias Biológicas** (en prensa).
11. Maribona R.H., Korneva S.B. and Ruiz A. Tissue Culture Congress (Conf. Pan-Soviética, Kishiniev, Moscú), 1984.
12. Maribona R.H., Korneva S.B., Ramos Leal M., Ruiz A. and Izquierdo F. Proc XIX ISSCT Congress (Commission Breeding), 1987.
13. Ruiz A. and Maribona R.H. Proc. XVIII ISSCT Congress (Commission Plant Physiology), 625, 1983.
14. Ruiz A., Maribona R.H., Korneva S.B., Ramos Leal M., Izquierdo F. and Hector E. Proc. XIX ISSCT Congress (Commission Plant Physiology), 1983.
15. Ruiz A., Mitchel R., Maribona R.H. y Pedraza E. X Seminario Científico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba, **Revista CENIC**, **19**, 1988.
16. López E. Manual de Normas y Procedimientos para el Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar en Cuba. Proyecto. 1984.
17. Shaeffe H. Analysis of variance, Wiley, New York, 1959.
18. Wricke G.Z. **Pflanz**, **52**, 127-138, 1964.
19. Heinz D.J. and Mee G.W.P. **Am. J.**, **58**, 3, 257-262, 1971.
20. Frías de Fernández A.M., Antoni H.J. y Lozzia de Canelada M.E., Agron. N.O. Argent. XII, 1-2, 1975.
21. Maribona R.H., Acosta E., Korneva S.B., Ruiz A. y Jorge H. X Seminario Científico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba, **Revista CENIC**, **19**, 1988.
22. Ploper G. y Mariotti J.A. Fundamentos de Genética Biométrica. Aplicaciones al Mejoramiento Genético Vegetal, 1988