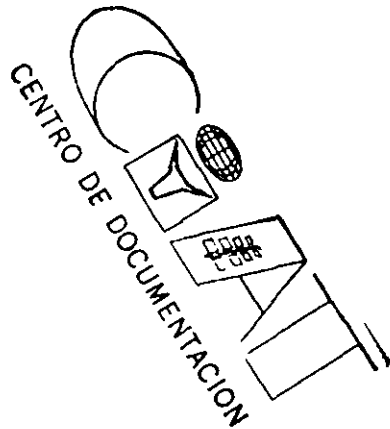


Caracterización de los Acervos Genéticos de  
Phaseolus vulgaris L , por medio de  
Electroforésis de isoenzimas

JAIME VARGAS



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

Plan de Estudios de Biología

1988

Caracterización de los Acervos Genéticos de  
Phaseolus vulgaris L , por medio de  
Electroforésis de isoenzimas

Jaime Vargas

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial  
para optar el título de Biólogo (Genético)

Joe Tohme Ph D

Director

Aktar Hussain Ph D

Co-Director

William M Roca Ph D

Co-Director

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

Plan de Estudios de Biología

Cali 1988

A P R O B A D O

Joe Tohme, Ph D  
Director Trabajo de Grado

Joe Tohme

Akhtar Hussain, Ph D  
Codirector

Akhtar Hussain

William M Roca, Ph D  
Codirector

\_\_\_\_\_

DEDICATORIA

A mi Madre,

mi Hermana

— y Claudia Lorena

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a

- Dr William M Roca por sus grandes aportes a mi formación como futuro profesional
- Aktar Hussain por sus enseñanzas en las técnicas electroforeticas
- Joe Tohme por su total apoyo
- Daniel Debouck por la revisión del manuscrito
- Miguel Angel Grajales
- Jose Gutierrez
- Danilo Posso
- Ariel Gutierrez
- Henry Terán
- Aracelly Fernandez
- Luz Amparo Cartagena
- Personal del Laboratorio de Investigación en Biotecnología del CIAT
- Al personal de fotografía, y artes Graficas del CIAT
- Centro Internacional de Agricultura Tropical

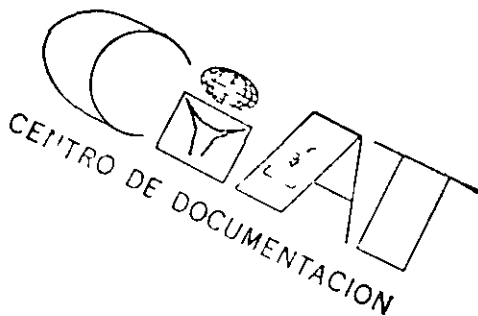
- Programa de Mejoramiento de Frijol del CIAT
  - Universidad del Valle
  - Y a todas aquellas personas que con su aporte así  
-- fuera el más mínimo, hicieron posible la culminación  
del presente trabajo
-

CONTENIDO

	Pagina
INTRODUCCION	1
1 REVISION DE LITERATURA	5
1 1 CLASIFICACION DEL FRIJOL	5
1 2 CLASIFICACION BIOQUIMICA	6
1 2 1 Proteinas de la semilla de frijol	6
1 2 1 1 Globulinas	6
1 2 1 2 Faseolina	6
1 2 2 Enzimas	7
1 2 2 1 Isoenzimas	8
2 MATERIALES Y METODOS	9

2 1	LOCALIZACION	9
2 2	SUMINISTRO DE SEMILLA	9
2 2 1	<u>Phaseolus vulgaris</u> L , domestico	9
2 2 2	<u>Phaseolus vulgaris</u> L , silvestre	10
2 2 3	Hibridos	11
2 3	TRATAMIENTO DE LA SEMILLA	11
2 4	PREPARACION DEL GEL DE ALMIDON	11
2 5	PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS MUESTRAS	12
2 5 1	Raiz	12
2 5 2	Hoja	13
2 6	COLOCACION DE LA MUESTRA, CORRIDA ELECTROFORETICA Y CORTE DEL GEL	13





2 7	TINCION	14
2 8	OBTENCION DE DATOS Y ANALISIS ESTADISTICO	14
3	RESULTADOS Y DISCUSION	16
3 1	CARACTERIZACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA	16
3 1 1	Análisis General de los Sistemas Isoenzimáticos	17
3 2	<u>Phaseolus vulgaris</u> L , SILVESTRE	21
3 3	ANALISIS DEL CRUCE BAT 477 x A195	24
3 4	<u>Phaseolus vulgaris</u> L , DOMESTICO	25
3 4 1	Análisis de los dos Grupos Principales	26

3 4 2	Análisis de los 10 Subgrupos	26
3 4 2 1	Subgrupo 1 y 2	27
3 4 2 2	Subgrupo 3 4 y 5	28
3 4 2 3	Subgrupo 6	30
3 4 2 4	Subgrupo 7	31
3 4 2 5	Subgrupo 8	32
3 4 2 6	Subgrupo 9	33
3 4 2 7	Subgrupo 10	33
---		
3 5	MATERIAL SIN UBICAR	34
3 6	EL CASO DEL GERMOPLASMA PERUANO	35
3 7	EL CASO DEL MATERIAL PERUANO EN EL GRUPO I	36
4	CONCLUSIONES	57
4 1	<u>Phaseolus vulgaris</u> L , domestico	57
4 2	<u>Phaseolus vulgaris</u> L silvestre	60

RECOMENDACIONES 62

RESUMEN 65

SUMMARY 67

-----  
BIBLIOGRAFIA 69

ANEXOS

## LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1 Resultado de 8 isoenzimas	38
TABLA 2 Codificación de variables	44
TABLA 3 Código de lugar de procedencia	44
---	
TABLA 4 Codificación de patrones isoenzimáticos	45

## LISTA DE FIGURAS

	Pagina
FIGURA 1 Dendograma	47
FIGURA 2 Variabilidad Genética de <u>Paseolus</u> <u>vulgaris</u> L .	49
FIGURA 3 Patrones de semillas que representan los centros de domesticación primaria del frijol cultivado	50
FIGURA 4 Patrón isoenzimático de $\alpha, \beta$ EST en <u>Paseolus vulgaris</u> L , domestico	52
FIGURA 5 Patrones de variación isoenzimática de <u>Paseolus vulgaris</u> L	54

## ABREVIATURAS

ACP	E C 3 1 3 2 Fosfatasa Acida
C	Constante
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DIA	E C 1 6 4 3 Diaforasa
$\alpha, \beta$ EST	E C 3 1 1 2 Aryl esterasa (Esterasa)
et al	colaboradores
F	del Ingles East (rapido)
F1, F2	Primera y Segunda generaci3n filial
GOT	E C 2 6 1 1 Transaminasa glut3mica oxaloacetica
I	Intermedio
MDH	E C 1 1 1 37 Malato dehidrogenasa
ME	E C 1 1 1 39 Enzima M3lica
MR	Movilidad relativa = distancia de una banda (x) sobre la distancia recorrida por el colorante colorante (frente de corrida)
N	del ingles Null (nulo)
Tipo I	H3bito de crecimiento determinado, el tallo termina en una inflorescencia
Tipo II	H3bito de crecimiento indeterminado, el tallo

termina en una yema vegetativa

Tipo III	Hábito de crecimiento indeterminado, semi postrado
Tipo IV	Habito de crecimiento indeterminado, trepador
PX	E C 1 11 1 7 Peroxidasas
R	Raro
RUBISCO	E C 4 1 1 39 Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa
S	del Ingles Slow (lento)
SKDH	E C 1 1 1 25-dehidrogenasa shikimica
U	Unico

## INTRODUCCION

El Frijol comun Phaseolus vulgaris L , nativo del hemisferio occidental, es un componente importante en la dieta de los paises en via de desarrollo, siendo una de las principales fuentes proteicas en América, Asia y Africa donde la proteina animal es escasa o cara (Bliss y Brown 1983)

Los centros internacionales de investigación agricola que adelantan programas de mejoramiento en frijol tienen entre sus objetivos obtener variedades mejoradas de frijol que tengan un mayor rendimiento y calidad de la semilla Para tal fin se requiere que los genotipos seleccionados, además de presentar genes para alto rendimiento y/o calidad, deban tener genes de resistencia a enfermedades, tolerancias a sequia y plagas, así como otras características agronómicas deseables tales como precocidad y capacidad de adaptación Es de gran importancia el conocimiento de la variabilidad genética de estas accesiones o grupos génicos, en el lugar de procedencia o centros de



domesticación para así adelantar programas de mejoramiento con éxito

Los fitomejoradores intentan transferir el potencial de rendimiento de accesiones de frijol de semilla pequeña a materiales de semilla grande, pero han encontrado restricciones en la obtención de híbridos viables, debido a un par de genes DL1 y DL2 (Coyne 1965, Shi et al 1980), que inhiben el desarrollo de la parte aérea y radicular Singh y Gutiérrez (1984), estudiaron la distribución geográfica de dichos genes, encontrando que existe una correlación positiva entre el gen DL1 asociado con semilla pequeña, característica del centro de domesticación de Meso America, y la falta de desarrollo de raíces Para el gen DL2 encontraron que está asociado con semillas grandes provenientes del centro de domesticación Andino, y la falta de desarrollo de la parte aerea Gepts y Bliss (1985) estudiaron los parentales que producen híbridos con fenotipo anormal, encontrando que los de semilla pequeña presentan faseolina tipo S y los de semilla grande presentan faseolina tipo T, con la conclusión, que en frijol existen dos centros de domesticación principales, el de Meso América y el de los Andes

Evans (1976), sugiere que el germoplasma de frijol (Phaseolus vulgaris L), de semilla pequeña fué domesticado en Centro America y el de semilla grande se domesticó en los Andes Sin embargo en los ultimos años han aparecido trabajos tendientes a elucidar su origen Con el estudio de los patrones electroforéticos de los tipos de faseolina, principal proteína de almacenamiento de la semilla (Ma y Bliss 1978) y debido a su gran polimorfismo, estabilidad ambiental y complejidad bioquímica se convierte en un buen marcador molecular para el estudio de este cultivo Gepts y Bliss (1986b), analizarón la variabilidad de los patrones electroforéticos de la faseolina asociando el tamaño de la semilla y tipo de faseolina con el centro de domesticación, encontrando que existe una dominancia del tipo de faseolina (S) en el centro de domesticación de Meso America y del tipo (T) en el centro de domesticación Andino

Gepts et al (1986a), con base en la variación de los patrones electroforéticos de la faseolina, definió un tercer centro de domesticación a nivel secundario para Colombia Singh (1988), basado en características morfo-agronómicas, adaptativas y de tamaño de semilla, propone la división de los dos centros principales de domesticación en 12 subgrupos

Con la utilización de las técnicas electroforéticas de isoenzimas, es posible cuantificar la variabilidad que ocurre en los diferentes grupos de germoplasma de frijol y correlacionarlo geográfica y genéticamente

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar bioquímicamente 175 líneas nativas y mejoradas de Phaseolus vulgaris L , de Norte, Centro y Sur America, Africa y Medio Oriente, para estudiar la variabilidad genética, mediante la variación de los patrones electroforéticos de las isoenzimas FOSFATASA ACIDA (ACP), DIAFORASA (DIA),  $\alpha, \beta$  ESTERASA (EST), MALATO DEHIDROGENASA (MDH), ENZIMA MALICA (ME), PEROXIDASA (PX), RIBULOSA BIFOSFATO CARBOXILASA OXIGENASA (RUBISCO), y DEHIDROGENASA SHIQUIMICA (SKDH), para explorar la base genética en la formación de grupos génicos e inferir su posible utilidad en programas de fitomejoramiento

Un segundo objetivo fué la búsqueda de un marcador isoenzimático que permita detectar a nivel de plántulas F2 de 10-15 días, híbridos anormales del cruce entre dos variedades, una de semilla pequeña y la otra de semilla grande

## 1 REVISION DE LITERATURA

## 1 1 CLASIFICACION DEL FRIJOL

Desde el punto de vista taxonómico el frijol es el prototipo del género Phaseolus (Debouck e Hidalgo 1985), cuyo nombre científico es

Orden	Rosales
Familia	Leguminoseae
Sub familia	Papilionoidae
Tribu	Phaseolae
Sub tribu	Phaseolinae
Género	Phaseolus
Especie	<u>Phaseolus vulgaris</u> Linneo

En el estudio taxonómico de formas silvestres y cultivadas del género Phaseolus, iniciado por Linneus en 1753, se han estudiado caracteres morfológicos tales como color, tamaño y forma de la semilla, hábito de crecimiento, color y longitud de la vaina, raíz, morfología de la flor y fruto (Freytag, 1965 Gentry, 1969, Maréchal et al , 1978)

1 2            CLASIFICACION DE ACUERDO A LOS COMPONENTES  
                  BIOQUIMICOS DE LA SEMILLA DE FRIJOL

Dentro de los estudios de clasificación que se han realizado en el genero Phaseolus con base en las técnicas bioquímicas, se han identificado los siguientes componentes de la semilla

1 2 1           Proteínas de la Semilla de frijol

1 2 1 1        Globulinas

Utilizando las fracciones G1 y G2 de la Globulina obtenidas de extractos de semilla, Boulter et al (1967), caracterizaron 12 tribus dentro de la familia Leguminosae Derbyshire et al (1976), agruparon las especies del genero Phaseolus y encontraron que Phaseolus coccineus, P dumosus y P vulgaris L presentaban un grupo relativamente cerrado

1 2 1 2        Faseolina

Brown et al (1981, 1982), Gepts (1984), Gepts et al (1986a) y Gepts y Bliss (1986b), estudiaron en extractos de semillas, la variación de los patrones electroforéticos de la faseolina en las formas cultivadas y silvestres. Los diferentes patrones de faseolina fueron codificados mediante una letra que corresponde a la inicial del nombre de la accesión en la que primero se describió dicho patrón.

Faseolina (S) del cultivar Sanilac,  
 (M) de Middle America (Centro America)  
 (T) del cultivar Tendergreen  
 (C) del cultivar Contender  
 (A) del cultivar Ayacucho  
 (H) del cultivar Huevo de Huanchaco  
 (B) del cultivar Boyacá 22  
 (CH) Chibcha de la accesión NI922 y NI937

Los tipos de faseolina S y M caracterizan al centro de domesticación de Meso America. Los tipos A, C, H y T caracterizan al centro de domesticación de los Andes y los tipos B y CH son marcadores de materiales de Colombia, posible zona de transición entre los dos centros.

## 1 2 2 1 Isoenzimas

En la caracterización del género Phaseolus y la especie Phaseolus vulgaris L , se ha utilizando la técnica de electroforésis de isoenzimas en diferentes tejidos y órganos, entre ellos raíz, tallo, hojas, plumula y cotiledones

En frijol se han descrito diferentes sistemas isoenzimáticos por West y Garber (1967), Bassiri y Adams (1978a, 1978b), Weeden (1983, 1984) Se ha encontrando variación de los patrones electroforéticos entre las principales clases comerciales de frijol Wall y Wall (1975), analizarón las enzimas Alcohol dehidrogenasa (ADH) y  $\alpha, \beta$  Esterasa (EST), entre las especies silvestres de Mejico se encontró una estrecha relación y una cerrada similaridad genética

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2 1 LOCALIZACION

El presente estudio fué realizado en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Biotecnología y en los invernaderos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado en jurisdicción del municipio de Palmira, Departamento del Valle del Cauca a 1006 metros sobre el nivel del mar con una temperatura promedio de 25 °C.

### 2 2 SUMINISTRO DE SEMILLA

#### 2 2 1 Phaseolus vulgaris L , doméstico

Las accesiones nativas y cultivadas fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de la Unidad de Recursos



Genéticos del CIAT, provenientes de Norte Centro y Sur América y parte del Medio Oriente. Estos lugares representan centros de domesticación primarios y secundarios o regiones de posible transición entre los centros de domesticación primarios.

Cada una de las accesiones fué escogida con base en características agro-económicas, hábito de crecimiento y tamaño y color de la semilla.

Las líneas mejoradas las suministró el Programa de Mejoramiento del Fríjol del CIAT.

2 2 2      Phaseolus vulgaris L , silvestre

Las accesiones 2097, 2098 y 2111 fueron suministradas por el Dr. Daniel Debouck de la colección realizada en Costa Rica al igual que la accesión 2295 colectada en Perú, las cuales se estudiaron a nivel preliminar para observar la posible existencia de variabilidad entre los dos sitios de colección.

## 2 2 3            Híbridos

El material híbrido resultante del cruce BAT 477 x A195  
fué suministrado por el Programa de Mejoramiento de  
frijol del CIAT

## 2 3                TRATAMIENTO DE LA SEMILLA

Las semillas se desinfestaron en una solución de  
hipoclorito de sodio al 0.5% durante 1-2 minutos,  
dependiendo de su tamaño. Luego fueron pregerminadas en  
papel de germinación a temperatura ambiente durante 1-2  
días, posteriormente se transplantaron individualmente a  
potes de icopor conteniendo una relación suelo/arena  
1:1. Por último se dejaron crecer en el invernadero a  
temperatura ambiente por 15 días.

## 2 4                PREPARACION DEL GEL DE ALMIDON

Para la preparación del gel se siguió la metodología  
descrita por Scandalios (1969) y Gottlieb (1973), y  
modificada para el presente trabajo.

En un erlemmeyer de 1000 ml con salida lateral, se mezcló 1 parte de buffer Litio-Borato pH 8.1 (Hidroxido de Litio 0.02 M, Acido Bórico 0.15 M), utilizado como buffer del electrodo y 10 partes de buffer Tris-Citrato pH 8.4 (Trizma Base 0.05 M, Acido Citrico 0.04 M), y almidón de papa hasta una concentración final de 10.6%. Los reactivos fueron suministrados por (SIGMA)

Se calentó en un mechero Bunsen hasta ebullición, y con agitación constante, se degasificó durante 15 segundos, y se vertió en un molde de plexiglass de 19 x 17 x 1.1 cms y se deja polimerizar por 1 hora, finalmente se cubrió con Saran-Wrap para evitar su deshidratación

## 2.5 PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO DE LAS MUESTRAS

### 2.5.1 Raíz

Se tomó 0.1 g de puntas de raíces de plántulas de 15 días de edad. El tejido se maceró con 25  $\mu$ l (microlitro) de buffer de extracción Tris-Malato 0.1 M pH 7.4, que contiene 20% glicerol, 5% de Triton X-100,

14 mM de 2-Mercaptoetanol y 10% de Polivinilpirrolidona (PVP-40)

2 5 2 Hoja

Se tomó 0.30 gr de tejido de hoja primaria y maceró con 30  $\mu$ l de buffer de extracción Tris-Malato 0.1 M pH 7.4 (descrito anteriormente) Todo el proceso se realizó a 5 °C.

Nota para las enzimas analizadas ver Anexo 1

2 6 COLOCACION DE LA MUESTRA, CORRIDA ELECTROFORECTICA Y CORTE DEL GEL

Las muestras eran embebidas en papel Whatman #3 de 5 mm x 11 mm, las cuales se insertan a 6.0 cm del extremo que va a ser el polo negativo (cátodo) En la primera y última posición del gel se coloca papel Whatman #3 de las dimensiones anteriormente descritas, impregnadas con colorante azul de bromofenol (0.1%), el cual se usa como indicador de corrida La corrida electroforética se realizó en una unidad de plexiglass a 40 mA durante 6-7 horas, hasta alcanzar un voltaje

máximo de 300 voltios, refrigerándose con bolsas con hielo con el fin de evitar el calentamiento del gel. Una vez finalizada la corrida, se cortó el gel en 5-6 capas de 2 mm de grosor.

## 2.7 TINCIÓN

Para la tinción de la actividad enzimática, se siguieron los protocolos descritos por Harris y Hopkinson (1976) para DIA  $\alpha$ , $\beta$ -EST, Weeden y Gottlieb (1980) para ME y SKDH. Weeden (1984) para ACP, GOT, PK, RUBISCO, algunos de los cuales se modificaron, refiriéndose al Anexo 1 para la descripción de los procedimientos de tinción.

## 2.8 OBTENCIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el método de mínima varianza de Ward (1963), por optimizar la mínima varianza dentro de los grupos y minimizar la varianza entre grupos, los datos analizados pueden ser variables cualitativas o cuantitativas.

Para el análisis de los patrones isoenzimáticos de las accesiones mostradas en la Tabla 1, se realizó un

análisis de grupos por medio del método de mínima varianza, usando el paquete estadístico del sistema de análisis estadístico (SAS, 1985) Los patrones isoenzimáticos fueron codificados de acuerdo al sistema mostrado en la Tabla 4 Los resultados codificados se estandarizaron a una media = 0 y una desviación estandar = 1

Para la definición de estos patrones se tomó como criterio la movilidad de una banda (x), con referencia a la muestra patrón para definirla como (F) del Ingles (Fast), para la posición rápida, (S) del Ingles (Slow), para la posición lenta y (N) de nula por la ausencia de una banda Figura 5 (B) Para la enzima DIA se tuvo en cuenta no solo la ausencia de una banda sino un grupo de bandas para la designación del patrón nulo (N), Figura 5 (A) Utilizandose además el patrón (I) de intermedio, referirse a la Figura 5 (C y D)

### 3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3 1 CARACTERIZACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA

Las enzimas ME, MDH, RUBISCO y SKDH, no presentan variabilidad a los patrones (F y S), mientras la enzimas (ACP, DIA, EST y PX) son las más polimórficas encontradas hasta el momento. La enzima  $\alpha, \beta$  EST Figura 4, presenta los patrones (F, I, N y S), la enzima DIA Figura 5 (A), es la de mayor variabilidad ya que presenta los patrones (F, N, R, S y U), la enzima ACP Figura 5 (B), presenta los patrones (F, N y S) y la enzima PX Figura 5 (C), presenta los patrones (F, I y S) para la parte catódica y el patrón constante (C) para la parte anódica en las formas cultivadas, y en las formas silvestres la parte anódica Figura 2 (A), presenta los patrones (C, F, S y R), siendo el patrón raro (R) una combinación de los patrones C y F

#### 3 1 1 Análisis General de los Sistemas Isoenzimaticos

$\alpha, \beta$  ESTERASA (EST) E C 3 1 1 1

Para el presente estudio se definió la migración relativa (MR), como la distancia recorrida por una banda (x) dividida por la distancia recorrida por el colorante encontrándose los patrones de migración (S) con una movilidad relativa (MR) = 28.8 y el patrón (F) con un MR = 32.4 (Figura 4). Debido a la débil tinción observada en geles de almidón y su poca capacidad de separación de las bandas, se utilizó el método de geles en poliacrilamida, con una concentración de 10% en el gel de separación y 4% para el gel concentrador, siendo modificada según lo descrito por Laemmli (1970) para un sistema discontinuo. Se encontró la presencia de una banda intermedia (I) con un MR = 31.5 como lo reportado por Weeden (1984) para geles en almidón.

Según lo reportado por Wall y Wall (1975) para EST-1 y EST-2, en extracto de semilla y lo reportado en el presente trabajo para el tejido de raíz, se requiere de un mayor estudio a nivel genético para esta enzima en geles de poliacrilamida, en vista del polimorfismo presentado para la zona EST-1 y la posible interacción con EST-2.



## DIAFORASA (DIA) E C 1 6 4 3

La Figura 5 (A), presenta los patrones isoenzimáticos (F, N, S, R y U), de la enzima DIA, encontrándose una mayor actividad de la enzima en raíz que en hojas. Además se observó que en geles de almidón el patrón (N) presenta 1 ó 2 bandas principales Figura 5 (A), y la presencia de 3 bandas para esta zona de manera constante para los 5 patrones encontrados en DIA, las cuales solo se observan en geles de poliacrilamida

---

 EOSFATASA ACIDA (ACP) E C 3 1 3 2

En la Figura 5 (B), se describen 4 zonas de actividad enzimática de esta enzima. En nuestro análisis solo incluimos la zona 3 Figura 5 (B), por presentar mayor variabilidad, que la zona 4 reportada por Weeden (1984), encontrándose los patrones (S) con una Movilidad Relativa (MR) = 15.75, un patrón (F) con un MR = 18 y un tercer patrón (N) que se caracteriza por la ausencia de esta banda.

## PEROXIDASA (PX) E C 1 1 11 7

La movilidad de esta enzima presenta dos frentes de migración anódico y otro catódico Figura 5 (C)

El frente anódico está caracterizado por tener 3 zonas de movilidad, la zona 1 con un par de bandas monomórficas, sin mostrar variabilidad en el frijol domesticado, en contraste de la variabilidad encontrada en los frijoles silvestres (ver sección 4 5 )

La zona 2 muestra 1 o dos bandas, variando con el estado de desarrollo de las plantas y las condiciones ambientales En esta zona se pueden apreciar los patrones (S F y N) Esta zona no se utilizó en nuestros análisis porque sus patrones no fueron constantes

Frente catódico Los patrones de peroxidasas que migran hacia el cátodo son más estables que los que migran hacia el ánodo y por tal motivo estos se utilizarán en nuestros análisis Las peroxidasas catódicas constituyen la zona 5 con los siguientes patrones de migración (F) con un MR =  $-43 \frac{3}{-33 \frac{3}{3}}$ , el patrón (S) con un MR =  $-43 \frac{3}{-27 \frac{7}{7}}$  y un tercer patrón (I) con un MR =  $-36 \frac{6}{6}$

## MALATO DEHIDROGENASA (MDH) E C 1 1 1 37

Tres patrones de bandas fueron obtenidos para la enzima MDH Figura 5 (D), el patrón (S) con un MR = 18/21 1, el patrón (F) con MR = 18/24 3 y un tercer patrón (I) con un MR = 19 8/21 1 , encontrado en las accesiones (G 811 y G 13614 de Mejico no incluidas en este estudio) y la G 13379 del Peru

## ENZIMA MALICA (ME)-E C 1 1 1 40

La actividad enzimatica de esta enzima, se manifiesta en plántulas de aproximadamente 7 dias representada por una banda que tiene un MR = 20 25 , que va desapareciendo con la edad En plántulas de aproximadamente 15 dias solo se detecta una debil banda Esta isoenzima presenta los patrones (S) con un MR = 12 6 y el patrón (F) con un MR = 13 5 Figura 5 (E)

## RUBISCO E C 4 1 1 39

En el análisis de esta enzima se encuentran los patrones, F y S correspondiente a la subunidad pequeña de la enzima según lo reportado por Weeden (1984)

DEHIDROGENASA SHIKIMICA (SKDH) E C 1 1 1 25

El patrón de tinción de esta enzima muestra una sola zona con dos bandas con un MR = 16 2/17 1 para el patrón (S) y un MR = 17 1/18 45 para el patrón (F) Mientras que Weeden (1984), reportó la presencia de una zona con los patrones (F y S)

TRANSAMINASA GLUTAMICA OXALOACETICA (GOT) E C 2 6 1 1

En la tinción de esta isoenzima se encontró un patrón muy constante entre los materiales de Phaseolus vulgaris L doméstico, a excepción de algunas accesiones de origen Peruano que presentan ausencia de la zona 1 (ver sección 3 2) La zona 2 muestra 3, 2 y hasta 1 banda que son expresadas según las condiciones medio ambientales de la planta. Esta enzima no está incluida en los análisis del presente estudio

Los materiales de tipo silvestre comprenden las accesiones 2097, 2111 y 2098, provenientes de Costa Rica y descritos por Debouck et al (1988 en prensa) y la accesión 2295 colectada en el Peru

PEROXIDASA (PX) Las accesiones 2097, 2111 y 2098 (6, 7 y 8) Figura 2 (A), presentaron un par de bandas con un  $MR = 30.6/31.5$  para la enzima PX en la zona 1 de la parte anódica, mientras que la accesión 2098 (7 y 8) presentaron un par de bandas adicionales con un  $MR = 28.8/29.7$ , similar y constante al encontrado en Phaseolus vulgaris L, doméstico e igual al presentado por la accesión 2295

Con los análisis de los patrones anódicos de Peroxidasa se sugiere que la accesión 2098 (7 y 8) de la Figura 2 (A), es un híbrido del cruce con un domesticado

FOSFATASA ACIDA (ACP) Las muestras 2097, 2111 y 2295 (8 y 9), Figura 2 (B), presentaron similar patrón al encontrado en Phaseolus vulgaris L, doméstico para esta enzima en las zonas 3 y 4 en la region anódica, mientras que la accesión 2098 (5 y 6) presentaron un

MR = 23 85 para la zona 2, más rápido que el presentado por Phaseolus vulgaris L , domestico que tiene un MR = 22 5

TRANSAMINASA GLUTAMICA OXALOACETICA (GOT) La presencia del patrón (N), manifestado por la ausencia y presencia de la zona 1 en la region anódica Figura 2 (C) (2 y 3), en la muestra 2295, (estudiadas dos plantulas) Lo anterior nos dice que Phaseolus vulgaris L silvestre presenta el mismo patrón al observado en Phaseolus vulgaris L , doméstico, tanto en el patrón normal que presenta las dos zonas, como también para el patrón (N) Es importante notar que dicho patrón solo se vió en las accesiones (G 19648, G 19702, G 19715, G 19716, G 19734 de frijol doméstico), con semillas de tamaño grande o mediano procedentes del Peru, en contraste al tamaño de la semilla de la accesión 2295 que es de tamaño pequeño Es importante conocer, cual es la relación de los frijoles cultivados y los silvestres con respecto al tamaño de la semilla

DIAFORASA (DIA) Las accesiones 2097, 2111, 2098, colectadas en Costa Rica (Debouck et al 1988) y la accesión 2295 procedente del Peru (Debouck, D G , comunicación personal) Figura 5 (A) (6-9), mostraron el

mismo patrón de migración (F) de la enzima DIA, similar al encontrado en Phaseolus vulgaris L , domestico para semilla de tamaño mediano-grande, en contraste al tamaño de la semilla de estas accesiones

Las enzimas ME, MDH, RUBISCO y SKDH presentaron patrones de migración idénticos a los reportados por Weeden (1984) en Phaseolus vulgaris L , doméstico

### 3.3 ANALISIS DEL CRUCE BAT 477 x A195



En el estudio realizado con este cruce cuya característica morfológica más importante es la diferencia en tamaño de la semilla Los pesos de las semillas fueron 20.62 g/100 semillas para BAT 477 y 51.2 g/100 semillas para A195 (Figura 3) Se encontró ausencia del par de bandas en la region catódica para la enzima  $\alpha, \beta$  EST que exhibe solamente actividad de tinción con el sustrato alfa naftil acetato (Wall y Wall 1975) Se observó además gran actividad de la enzima PX en plántulas que presentaban inhibición del crecimiento radicular Al igual que la enzima SKDH, que presenta un patrón más rápido que el patrón (F)

Además de los patrones isoenzimáticos antes mencionados se hizo un estudio del tipo de faseolina de los genotipos parentales involucrados en dicho cruce, usando la metodología descrita por Ma y Bliss (1978), modificada por M Triana (comunicación personal), encontrándose que el parental con semilla pequeña presentó faseolina de tipo (S) y el parental con semilla grande presenta faseolina de tipo (T) Dichos resultados están de acuerdo con lo reportado por Gepts y Bliss (1985), para la distribución geográfica del tipo de faseolina y la asociación del carácter anormal con el tamaño de semilla y la existencia de los dos centros de domesticación primaria del frijol, los cuales son confirmados en el presente trabajo mediante el análisis de 8 sistemas isoenzimáticos

### 3 4 Phaseolus vulgaris L , DOMESTICO

Del análisis Estadístico de los patrones electroforéticos de las 8 isoenzimas descritas en el presente estudio, se obtuvo un dendograma Figura 1, en el cual se aprecian dos grupos principales con 5 subgrupos en cada uno de ellos Estos subgrupos explican casi toda la variabilidad



### 3 4 1 Análisis de los dos Grupos Principales

Las 175 accesiones estudiadas, pertenecen a diferentes hábitos de crecimiento (Singh 1982), color y tamaño de la semilla Sin embargo de un exámen minucioso de los grupos principales se encuentra que la gran mayoría de las accesiones del grupo I pertenecen al centro de domesticación de Meso America, mientras que la vasta mayoría del grupo II pertenecen al centro de domesticación Andino Los resultados confirman lo reportado por Sprecher (1988) y Gepts (presentación personal, Taller Internacional de Frijol IBYAN Nov de 1987)

---

### 3.4 2 Análisis de los 10 Subgrupos

Dentro de los 2 grupos principales, 10 subgrupos pueden ser definidos Se encontró que el centro de domesticación de Meso América presenta 5 subgrupos Lo mismo que el centro de domesticación Andino Se presentaron algunas excepciones las cuales son explicadas en el análisis de los 10 subgrupos y en las secciones 3 5-3 6 Los cuales son de gran interes en el estudio de las relaciones genéticas inter e intra grupos, ayudando a

esclarecer un poco la estructura genética del germoplasma del frijol

### 3 4 2 1      Subgrupos 1 y 2

En el subgrupo 1 (Tabla 1), se encuentra alta homogeneidad de los 8 sistemas isoenzimáticos, a excepción del polimorfismo presentado por las enzimas PX que presenta los patrones (F, S e I) y la enzima DIA con los patrones (F, U y N), mientras que la enzima EST presenta los patrones (S y F), encontrándose que las accesiones 11, 57, 69, 73 y 181 varían solamente a nivel de un sistema isoenzimático mientras que las accesiones 22, 55 y 203 presentan variación a dos sistemas isoenzimáticos

En el subgrupo 2 (Tabla 1), los sistemas isoenzimáticos ACP, DIA, MDH y SKDH, no presentan variabilidad, mientras que PX presenta los patrones (F, S e I), no siendo así con las enzimas EST, ME y RUBISCO que presentan variación en uno ó dos sistemas para las accesiones 4, 68, 71, 100 y 180

En el grupo de Meso America, las accesiones de los subgrupos 1 y 2, son principalmente líneas de semilla pequeña y tipo II erecto que se caracterizan por tener un patrón DIA (U), según lo reportado por Sprecher (comunicación personal) y Gepts (presentación personal, Taller Internacional de Frijol IBIAN Nov 1987)

Las líneas Mejicanas (G 4360, S 28453 y G 2597), presentaron un patrón de DIA diferente, las cuales fueron agrupadas con el tipo II, lo mismo que la líneas (G 19479 G 19616, G 19609 y G 19643), procedentes del Peru

3 1 2 2      Subgrupos 3,4 y 5

En el subgrupo 3 (Tabla 1), las enzimas MDH, y SKDH, no presentan variabilidad en este subgrupo, la enzima EST presenta el patrón (F) a excepción de la accesión 96 que es (S) mientras que la enzima ACP presenta variación en la accesión 12 que es (N) y la accesión 34 que es (F), las enzimas RUBISCO, ME, y DIA, presentan los patrones (F y S) dentro de este subgrupo encontramos que la enzima PX es la más polimórfica por presentar los patrones (F,S e I)

En el subgrupo 4 (Tabla 1), se encuentra que las enzimas ACP y MDH no presentan variabilidad mientras que la enzima EST presenta el patrón (N), siendo exclusivo a este subgrupo con la excepción de la accesión 36 que es (F), la enzima RUBISCO a excepción de la accesión 126 que tiene un patrón (S) presenta el patrón (F) Las enzimas SKDH y ME presentan los patrones (F y S), mientras que la enzima DIA tiene el patrón (S), las accesiones 36 y 94 presentan el patrón (U) y la enzima PX que es la mas variable en este subgrupo presenta los patrones (F, S e I)



En el subgrupo 5 (Tabla 1), se encuentra muy poca variabilidad convirtiendolo, dentro de este estudio en el más ligado genéticamente, como se puede apreciar con la enzima PX en la que un 73.3% de las accesiones presentan el patrón el (F) y un 26.6% presentan el patrón (S), y la isoenzima DIA presenta el patrón (S), a excepción de las accesiones 30 y 115 que presentan el patrón (F)

El subgrupo 3 contiene principalmente material de semilla pequeña-mediana del centro de domesticación de Meso America Estas líneas son hábito de crecimiento I, III o IV

Los subgrupos 4 y 5 también pertenecen al centro de domesticación de Meso America estos materiales son del tipo Pinto o estrechamente relacionado al tipo Pinto del altiplano de Mexico

### 3 4 2 3 Subgrupo 6

En el subgrupo 6 (Tabla 1), la enzima MDH no presenta variabilidad La enzima EST presenta variación en la accesión 93 y la enzima SKDH presenta variación en la -accesión 77, las enzimas RUBISCO y ME presentan los patrones (F y S), mientras que las enzimas DIA, ACP y PX presentan los patrones (F, S y N), siendo por esta razón las más variables dentro de este subgrupo

Este subgrupo incluye un gran numero de accesiones, que pertenecen al grupo de semilla grande Son principalmente de semilla grande, las accesiones del tipo rojo Kidney (como Mecosta), cranberry (como Misanfu Speckeld sugar) ó del tipo blanco grande (como Musolini), tipo Canario (como Canario 101) En general estas líneas tienen tipo de faseolina T, C o H y pertenecen al centro de domesticación Andino Presentando hábito de crecimiento tipo I, III y IV

## 3 4 2 4 Subgrupo 7

En el subgrupo 7 (Tabla 1), las isoenzimas SKDH, ME, MDH y EST no presentan variabilidad en sus patrones electroforéticos, la enzima ACP presenta el 66.6% del patrón (N) y un 33.3% del patrón (S), la enzima RUBISCO presenta los patrones (F y S), la enzima PX esta caracterizada por el patrón (I), con excepción de las accesiones 17 y 192 que presentan el patrón (F), mientras que la enzima DIA es la más variable dentro de este subgrupo por presentar los patrones (F, S y N)

Las accesiones de este subgrupo son principalmente Peruanas de tipo IV (volubles), pertenecientes al departamento de Cajamarca, Peru (Debouck 1985-1986), con la excepción de las accesiones G 13094 y G 13739 de origen Mejicano, la accesión G 1892 de Honduras y la accesión G 5478 de Estados Unidos

El 66.6% de las accesiones de este subgrupo son (N) para la enzima ACP, en la zona 3 Figura 5 (B), las cuales son de origen Peruano a excepción de la accesión G13094 que es de Mejico Este patrón se encuentra además en otros subgrupos, como es el caso la accesion G 5165 procedente

de los Estados Unidos en el subgrupo 1, la accesión G 1540 procedente de Suecia en el subgrupo 6 y la accesión G 201 procedente de Turquía en el subgrupo 9. Podrán considerarse estas accesiones como posibles introducciones peruanas? ó cual sería su relación con el centro de domesticación Andino

### 3 4 2 5 Subgrupo 8

En el subgrupo 8 (Tabla 1), las enzimas SKDH y EST no presentan variabilidad en su patrón electroforético, encontrándose variación en las enzimas RUBISCO, PX, ME y DIA en una ó dos accesiones la enzima ACP presenta los patrones (S y N) y la enzima MDH presenta un 50% con el patrón (S) y el otro 50% con (F)

Las accesiones de este subgrupo son exclusivamente del departamento de Cajamarca, Peru, con la excepción de la accesión 79 (línea mejorada de semilla mediano, blanca proveniente de la Universidad del Estado de Michigan) Aunque la línea es de tipo "navy" de un solo tallo y hábito de crecimiento II, con faseolina tipo T (Tohme, comunicación personal), sugiriéndose que es el producto de algún cruzamiento con el tipo kidney de tipo peruano

## 3 4 2 6 Subgrupo 9

En el subgrupo 9 (Tabla 1) , las enzimas SKDH, ME MDH y EST no presentan variabilidad en sus patrones electroforéticos, la enzima DIA presenta el patrón (F) a excepción de la accesión 179 que es (N), la enzima RUBISCO, presenta además del patrón (S) el patrón (F) para las accesiones 18, 106, 110 y 49, la enzima PX a excepción de la accesión 106 que es (S), presenta los patrones (F e I)

---

Este subgrupo contiene un gran numero de accesiones con tipo I de semilla grande, sea material mejorado o nativo

## 3 4 2 7 Subgrupo 10

En el subgrupo 10 (Tabla 1), las enzimas EST y ME no presentan variabilidad en sus patrones electroforéticos Las enzimas ACP y RUBISCO, presentan los patrones (N y S) y (F y S) respectivamente La enzima SKDH presenta el patrón de migración (S), a excepción de las accesiones 149 y 178 que presentan el patrón (F) La enzima MDH presenta el patrón (F) a excepción de la accesión 178 con



el patrón (I) La enzima PX presenta los patrones (I y F), la enzima DIA es la más polimórfica dentro de este subgrupo ya que presenta los patrones (F, S y N)

Este subgrupo es similar subgrupo 7 en el sentido de que contiene material del Departamento de Cajamarca, Peru, con excepción de Calima y Mutiki II Las accesiones son nativas con habito de crecimiento tipo IV Sin embargo, el árbol genealógico de Calima muestra material con tipo IV.

---

### 3 5 MATERIAL SIN UBICAR

En los dos grandes grupos o centros de domesticación podemos observar que hay subgrupos con algunas accesiones que parecen que no encajaban en el subgrupo correcto, porque morfológicamente y por su tipo de faseolina, parecen ser diferentes de otras líneas dentro del subgrupo Estos son la accesión 37 del subgrupo 3, las accesiones 30 y 115 del subgrupo 5, las accesiones 83,91,92,127 y 129 en el subgrupo 6, las accesiones 16,17 y 66 en el subgrupo 7 La unica diferencia encontrada en estos materiales fuerón los patrones isoenzimáticos de DIA Las accesiones de semilla grande dentro del grupo

de semilla pequeña como las accesiones 30,37 y 115, tienen el patrón de DIA (F), el cual es propio y consistente en accesiones de semilla grande. Por otra parte, las accesiones 16,17,66,83,91,92,127 y 129 todas de semilla pequeña, están dentro de un subgrupo de semilla grande, teniendo un patrón de DIA (S)

### 3 6            El CASO DEL GERMOPLASMA PERUANO

Con la excepción del pequeño subgrupo 4, cada subgrupo tiene varias líneas de la colección de Cajamarca, Peru

No se puede descartar la posibilidad de que alguna de esas líneas nativas son en realidad introducciones de otros lugares, aun del centro de domesticación de Meso America, como lo sugiere D Debouck (comunicación personal). La determinación del tipo de faseolina de estas líneas es necesaria para ayudar a clarificar este hecho

Varias líneas de la colección Peruana tienen patrón de DIA (N). Previamente estos (N) han sido reportados solamente en el germoplasma de Turquía (Sprecher, comunicación personal y el presente trabajo). Cual es el

significado de los (N), especialmente en vista de que la mayoría de los otros patrones de DIA parecen estar correlacionados a grupos específicos? Y, cual es la relación entre los (N) de Turquía como centro de domesticación secundario y el centro de domesticación Andino considerado como centro de domesticación primario?

### 3 7 EL CASO DEL MATERIAL PERUANO EN EL GRUPO 1

El caso de las accesiones 171, 180 y 181 es importante para el entendimiento de la estructura genética del germoplasma de frijol. Siendo estas accesiones "Weedy" tipo IV (Debouck 1985-1986), con un patrón de DIA (U), se agrupan con el tipo II erecto del centro de domesticación de Meso America. La determinación del tipo de faseolina es crucial. Si la faseolina es del tipo Mexicano, la pregunta ha hacerse es sobre la relación entre el "Weedy" tipo IV y el tipo II. Especialmente que es casi cierto que esas líneas son tipo Weedy (Debouck 1985-1986). Si el tipo de faseolina indica un origen Andino, la pregunta entonces será: Cual es la relación con el tipo II de Meso America y que implicación tendrá con relación al efecto de tomar germoplasma y seleccionar alguna característica e irse estrechando la base genética?

Debemos recordar que casi todos los patrones de DIA (U) son de tipo II o muy relacionados al frijol negro del Centro America Si las accesiones son de origen Andino, porqué los DIA (U) no aparecen en ninguno de los materiales cultivados que han sido analizados en el centro de domesticación Andino?

---

TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

PORT NUM 6	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEN	ORI	T S	H C	RUB	SKOH	ME	ACP	MDH	EQT	PX	DIA	SG
1 6 5778	ICA PIJAO		CLB	24	2	F	F	F	S	S	S	F	U	1
3 6 4495	PORRILLO SINTETICO		ELS	22	2	F	F	F	S	S	S	F	U	1
5 6 4459	NEP-2		CRA	16	2	F	F	F	S	S	S	S	U	1
57 6 4060	PEP BAYO 22	C-286	CRA	19	2	F	S	F	S	S	S	S	U	1
73 6 5472	OH-85		CRA	16	2	F	S	F	S	S	S	S	U	1
7 6 3643	TAMAPA	I-810	MEX	20	2	F	F	F	S	S	F	F	U	1
171 61 416		D6D-961	PER	24		F	F	F	S	S	F	F	U	1
7 619 22	MITA L-227-1		POI	18		F	F	F	S	S	F	S	U	1
11 6 51 5	BLACK TORTLE SOUP	BZL-0966	USA	23	2	F	F	F	N	S	F	S	U	1
59 6 4 9	JUILAPA 72		GTA	21	2	S	F	F	S	S	F	F	U	1
<del>181 619613</del>		D6D-054	PER	13		S	F	F	S	S	F	F	U	1
22 6 8750	CHIHUAHUA 11-A		M X	41	3	F	F	F	S	S	F	F	F	1
38 6 8	OJO DE CABRA SANTA RITA		MCX	30		F	F	F	S	S	F	F	N	1
55 6 47	AGUASCALIENTES 14-3 MEX-63	PI313724	MEX	41	4	F	F	F	S	S	F	I	F	1
203 61247		D6D-991	PER	23		F	F	F	N	S	F	I	N	1
4 6 1741	PORRILLO NO 1	PI307824	ELS	20	2	F	S	S	S	S	S	F	U	2
71 6 4 7	TURRIALBA NO 1 LOTE 9		BZL	17	2	S	S	S	S	S	S	F	U	2
31 6 44	ICA TUI		CLB	21	2	F	S	S	S	S	F	S	U	2
44 XAN 112	XAN IB-X SEL 26		CIA	25		F	S	S	S	S	F	F	U	2
68 6 3707	VERANTIC 2	I-980	MCA	23	2	S	S	F	S	S	F	F	U	2
100 6 6099	MEXICO 11		MEX	16	3	F	S	F	S	S	F	F	U	2
70 6 4792	51052			19	2	S	S	S	S	S	F	F	U	2
180 617479		D6D-819	PER	42		S	S	S	S	S	F	I	U	2

TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

TPT	NUM 6	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEN	ORI	T S	H C	RUB	SKDH	ME	ACP	MDH	EST	PX	DIA	SG		
	6 6	4493		ICA BUNSI				CLB	12	2	F	F	F	S	3		
105	6	4667	MAGDALENA 9 ZARAGOZA BLANCO	MAG-008	CLB	21	3	F	F	F	S	S	F	S	3		
	12	6	4017	CARIOCA	P-154	BZL	28	3	F	F	F	H	S	F	S	3	
	8	6	4498	SANILAC		USA	14	1	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	13	6	5899	PIYTO NACIONAL		MEX	35	3	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	33		528391	BAYO DURANGO		MEX	30		F	F	F	S	S	F	F	S	3
	39	6	3017	MEZCLA	6TA-084	GTA	22	2	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	67	6	17722	SAN CRISTOBAL 83		DOM	29		F	F	F	S	S	F	F	S	3
	65	6	1149	MICHELITE	PI289466	USA	17	4	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	75	6	13707	BAYO GERDO	CP-316	MEX	52	4	F	F	F	S	S	I	F	S	3
	72			BAYO CRIDILLO DEL LLANO		MEX	47		F	F	F	S	S	F	F	S	3
	99	6	3694	CORNELL 49-242	---	USA	22	2	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	112	6	577	HARLAN NO 9271 DILMASON	PI177037	TKY	33	3	F	F	F	S	S	F	F	S	3
	148	6	19603		D6D-948	PER	20		F	F	F	S	S	F	F	S	3
	196	6	19449		D6D-783	PER	28		F	F	F	S	S	F	F	S	3
	96	NAB	58	BAT 1225 X BAT 1136		CIA	37		F	F	F	S	S	S	F	S	3
	20	6	7612	MEXICO 222	B1644	MEX	56	3	S	F	F	S	S	F	F	S	3
	130	6	4399	TAMAULIPAS 9-9		MEX	22	3	S	F	F	S	S	F	F	S	3
	133	6	1269	IYT 7233	1YT-73321	NLD	26	3	S	F	F	S	S	F	F	S	3
	137	6	5711	COMPUESTO CHINALTEWANGO 2		GTA	24	3	S	F	F	S	S	F	F	S	3
	71	6	19440	DURANGO 222		MEX	43		S	F	F	S	S	F	F	F	3
	150	6	19605		D6D-950	PER	22		S	F	F	S	S	F	S	S	3
	34	6	18446	BAYO MADERO		MEX	45		S	F	F	F	S	F	F	S	3
	37	6	18270	CACAHUATE LARGO		MEX	50		S	F	S	S	S	F	I	F	3
	43	6	3807	BRASIL 2-PICO DE ORD	I-1098	BZL	27	1	F	F	S	S	S	F	F	S	3
	45	6	1320	TLALNEPANTLA 64	PI207262	MEX	25	3	F	F	S	S	S	F	F	S	3
	47	6	2883	PRINCESS OF ARTOIS	PI319861	CDA	40	1	F	F	S	S	S	F	F	S	3
	174	6	3618	GUANAJUATO 31 = MEX 168	PI313755	MEX	31	3	F	F	S	S	S	F	F	S	3
	56	6	3470	MICHOACAN 121		MEX	37	1	F	F	S	S	S	F	I	F	3
	102	6	428	HARLAN NO B225 BARBUNYA	PI173037	TKY	28	1	F	F	S	S	S	F	I	F	3

TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

TRT NUM S	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEN	ORI	T S	H C	RUB	SKDH	MF	ACP	MDH	EST	PX	DIA	JG
14 G 4449	PINTO U I 114		USA	36	3	F	F	F	S	S	N	I	S	4
118 G 6 84				30		F	F	F	S	S	N	F	S	4
15 G 6271	PINTO DURAY		USA	30	1	F	F	F	S	S	N	F	S	4
125 S 5476	JULES		USA	19	3	S	S	F	S	S	N	F	S	4
48 G 5 5	AGUASCALIENTES 11 4		MEX	30	3	F	S	S	S	S	N	F	S	4
<del>93 BAT 332</del>	<del>BAT 332</del>		CIA	14		F	S	S	S	S	N	S	S	4
36 G 5719	MUSORA		USA	14	3	F	S	F	S	S	F	S	U	4
54 BAT 97	BAT 93		CIA	35		F	S	S	S	S	M	S	U	4
30 G 164	VALD 90	PI298109	BZL	38	3	F	S	F	S	S	F	F	F	5
115 G 9	SABANINA (S 74)	IPV-20	MCA	31	1	F	S	F	S	S	F	F	F	5
42 G 9959	SENTRY 22220 ZACATICANO	PI319665	MEX	30	3	F	F	F	S	S	F	F	S	5
50 G 474	W KOELZ NO 10187 CHIMI	PI174913	IND	26	4	F	F	F	S	S	F	F	S	5
53 G 2 77	SENTRY 21780 BEL G TD	PI311861	GTA	22	4	F	S	F	S	S	F	F	S	5
54 G 7 7	SENTRY 21955 SARPAPATO	PI312092	MEX	33	3	F	S	F	S	S	F	F	S	5
75 G 1140	MICHODACAN 20	MEX-343	MEX	40	4	F	S	F	S	S	F	F	S	5
86 G 5710	CREAT NORTHERN U 1 51		USA	26	3	F	S	F	S	S	F	F	S	5
97 PHC	BAT 1225 X BAT 740		CIA	22	3	F	S	F	S	S	F	F	S	5
164 CIA		D6D-746	PER	14		F	S	F	S	S	F	F	S	5
19 G 19 04		D6D 844	PER	17		F	S	F	S	S	F	F	S	5
35 G 40	ROSIHA G-2		BZL	24	2	F	S	F	S	S	F	S	S	5
98 BAT 477	BAT 477		CIA	22		F	S	F	S	S	F	S	S	5
102 G 540	TURRIALBA 4-N	PI288014	CRA	16	2	F	S	F	S	S	F	S	S	5
103 G 1 5	SAN FERNANDO S 180 N	PI288018	CRA	16	2	F	S	F	S	S	F	S	S	5
9 G 6415	MECOSTA G03		USA	57	1	S	S	S	S	S	F	I	F	6
26 G 17709	MORTINO	SA&UDD0045	CLB	86	4	S	S	S	S	S	F	I	F	6
197 G 790	HARLAN NO 7048 BARBUNYA	PI171790	TKY	46	3	S	S	S	S	S	F	I	F	6
134 G 17487	KUSSOLINI		CLE	51	3	S	S	S	S	S	F	I	F	6
153 G 1966		D6D-1013	PER	38		S	S	S	S	S	F	I	F	6
176 G 19506	PAJURO (LLANDUMA)	D6D-657	PER	54		S	S	S	S	S	F	I	F	6
177 G 19340		D6D-661	PER	56		S	S	S	S	S	F	I	F	6
51 G 573	HARLAN NO 5832 BARBUNYA	PI179421	TKY	67	3	S	S	S	S	S	F	I	N	6
25 G 5707	CARGAMENTO		CLB	49	4	S	S	S	N	S	F	F	F	6

TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

TRT NUM G	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEV	DRI	T S	P C	RUB	SKDH	ME	ACP	MOH	EST	PX	DIA	SS
57 6 1540	BAKON	PI294703	SWD	31	1	S	S	S	N	S	F	F	F	6
136 6 6405	CHABELO		ECD	40	3	S	S	S	N	S	F	F	F	6
40 6 177	JATU RO'G (W KOELZ NO 8477	PI153120	IND	29	1	S	S	S	S	S	F	I	F	6
116 6 7160	TORTOLAS X DIANA		C'E	48	4	S	S	S	S	S	F	F	F	6
121 6 14470	MISAMFU SPECKLED SUFAR		ZBA	57	3	S	S	S	S	S	F	F	F	6
127 6 2430	BOLA 60 DIAS 44 (LOJA	CAT-0990		39	1	S	S	S	S	S	F	F	S	6
104 6 191	HARLAN NO 249 SIYAH FASUL	PI1670J1	TKY	44	1	S	S	S	S	S	F	S	F	6
12 6 10511		D6D-956	PER	32		S	S	S	S	S	F	S	S	6
103 6 51		D6D-960	PEP	23		S	S	S	S	S	F	S	S	6
91 6 7540	PATA DE ZOPE		GTA	23	3	F	S	S	S	S	F	F	S	6
97 6 17450	ORFED-IMIA		CLE	24	2	F	S	S	S	S	F	F	S	6
110 6 10_ 8	POSA			43		F	S	S	S	S	F	F	F	6
10 6 76	RED KIDUD		USA	49	1	F	S	S	F	S	F	I	F	6
27 6 18 74	BARSUNYA	PI171795	TKY	45		F	S	S	F	S	F	I	F	6
101 6 5 91	CACAHUATE 72		MEX	39	1	F	S	S	F	S	F	F	F	6
54 6 57	SWEDISH BPOWY	PI136775	CDA	38	1	S	S	S	F	S	F	I	F	6
67 6 76 0	CANARIO 101	I-813	MEX	33	1	S	S	S	F	S	F	I	F	6
72 6 77	CIAS 72		MEX	44	2	S	S	S	F	S	F	I	F	6
73 6 4470	POMPADOUR			41	1	S	S	S	F	S	F	I	F	6
28	KILYNUKWE		RWA	47	3	S	S	S	F	S	F	F	F	6
122 6 7640	CANARIO 107	I-814	MEX	42	1	S	S	S	F	S	F	F	F	6
93 6 17 827	BAT 887		CIA	25		S	S	S	F	S	F	F	F	6
29 6 14777	CRANBERRY	FRC-0524	CDA	42	3	S	S	F	S	S	F	F	F	6
123 6 4323	ICA PALMAR = LINEA 17		CLB	40	1	S	S	F	S	S	F	F	F	6
87 6 97	RABIA EL 6470	GTA-058	GTA	19	3	S	S	F	S	S	F	F	S	6
129 6 53	PUEBLA 152		MEX	34	3	S	S	F	S	S	F	F	S	6
160 6 10 52		D6D-673	PER	50		S	S	F	S	S	F	I	N	6
141 6 19373		D6D-695	PEP	50		S	S	F	S	S	F	I	N	6
175 6 19719		D6D-1075	PER	47		S	S	F	S	S	F	I	F	6
77	GAPBANCILLO ZARCO		MEX	37		F	F	S	F	S	F	F	S	6
114 6 996	BAYOMEX		MEX	39	1	S	S	F	F	S	F	F	S	6
78 6 20793	LEBARDON 1		LBN	40		S	S	F	F	S	F	I	F	6
178 6 45	MERVELLE DU MARCHE	PI136709	CDA	36	3	S	S	F	F	S	F	I	F	6



TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

TRT NUM b	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEN	ORI	T S	H C	RUB	SYDH	ME	ACP	MDH	EST	PX	D'A	SG
16 613739	FLOR DE MAYO	A-1393	MEX	35	3	F	S	F	S	S	F	I	S	7
66 6 1892	GENTRY 21647 SANGRETORO	P1310555	HDR	24	3	F	S	F	S	S	F	I	S	7
200 619590		D6D-935	PER	47		F	S	F	S	S	F	I	S	7
17 6 5478	TARA		USA	33	3	F	S	F	S	S	F	F	F	7
147 619376		D6D-699	PER	54		F	S	F	S	S	F	I	N	7
147 619584		D6D-929	PER	22		F	S	F	N	S	F	I	S	7
193 619385		D6D-708	PEP	37		F	S	F	N	S	F	I	F	7
194 619392	PILON (LLAPA)	D6D-716	PER	54		F	S	F	N	S	F	I	F	7
197 619370		D6D-692	PER	48		F	S	F	N	S	F	F	F	7
147 619461		D6D-796	PER	38		F	S	S	I	S	F	I	N	7
84 613004	MAYDCOBA		MEX	50	1	S	S	F	N	S	F	I	F	7
156 619707	PILON	D6D-1055	PER	72		S	S	F	N	S	F	I	F	7
186 619662		D6D-1012	PER	43		S	S	F	N	S	F	I	F	7
189 619649		D6D-1052	PER	98		S	S	F	N	S	F	I	F	7
163 619412		D6D-740	PER	41		S	S	F	N	S	F	I	S	7
79	MSU 79'515		MIC	19		S	S	F	S	S	S	I	F	8
191 619358	CALCHAQUITO (YATUN)	D6D-679	PER	51		S	S	F	S	S	S	I	F	8
145 619384		D6D-707	PER	60		F	S	F	S	S	S	I	F	8
174 619706		D6D-1059	PER	45		S	S	F	N	S	S	F	F	8
188 619695	GLORIABAMBA	D6D-1049	PER	58		S	S	F	N	S	S	I	S	8
154 619666		D6D-1016	PEP	47		S	S	S	S	F	S	I	F	8
180 619660		D6D-1010	PER	34		S	S	F	S	F	S	I	F	8
155 619503	BAYITO (CAJABAMBA)	D6D-1033	PER	58		S	S	F	N	F	S	F	F	8
178 619557		D6D-902	PER	43		F	S	F	N	F	S	I	F	8
184 619648		D6D-997	PER	50		S	S	F	S	F	S	I	F	8

TABLA 1 RESULTADO DE 8 ISOENZIMAS

TR* NUM G	NOMBRE DE LA LINEA	COD IDEM	ORI	T S	H C	RUB	SKDH	ME	ACP	MDH	EST	PX	DIA	%
18 611206	CANELLINI	IVT-77917	ITL	51	1	F	S	S	S	F	F	I	F	9
74 6 9603	JALO EEP 558	CNPAF-0991	BZL	34	3	S	S	S	F	F	F	I	F	9
109 6 5707	CANARID DIVEX B130		PER	31	1	S	S	S	S	F	F	I	F	9
46 6 4450	ROYAL RED		USA	49	1	S	S	S	S	F	F	F	F	9
117 6 6592	CANADIAN WONDER		USA	38	1	S	S	S	S	F	F	F	F	9
125 6 6416	MONTCALM 023		USA	44	1	S	S	S	S	F	F	F	F	9
172 619679	CASAYUAY	D6D-984	PER	36		S	S	S	S	F	F	F	F	9
19 6 51	SWEDISH BROWN	P1136716	COA	35	1	S	S	S	F	F	F	I	F	9
105 617093	TEFEYSIK FASULYESI	P1339543	TKY	53	1	F	S	S	S	F	F	S	F	9
110 6 570	HARLAN NO 9911 SONABARITH	P1181788	LBV	40	1	F	S	S	F	F	F	F	F	9
24 6 5708	SANRETORO		CLB	41	1	S	S	S	N	F	F	I	F	9
170 61549		D6D-893	PER	43		S	S	S	N	F	F	F	F	9
179 619427	CHIMBE	D6D-792	PER	52		S	S	S	N	F	F	I	N	9
49 6 701	HARLAN NO 539 FASULYA CAT	P1167345	TYV	47	3	F	S	S	N	F	F	F	S	9
165 619420		D6D-748	PER	37		F	S	F	N	F	F	I	F	10
158 619718		D6D-1074	PER	44		S	S	F	S	F	F	I	F	10
37 6 1853	DIACOL CALIMA	P1310511	CLB	48	1	F	S	F	S	F	F	F	F	10
142 524999	MUTIKI II			44	1	F	S	F	S	F	F	F	F	10
204 619717		D6D-1073	PER	43		F	S	F	S	F	F	F	F	10
166 619421	PINTADO (MAYGASBANDA)	D6D-749	PER	29		F	S	F	N	F	F	I	S	10
199 619587		D6D-927	PER	25		F	S	F	N	F	F	I	S	10
177 619698		D6D-1051	PER	83		F	S	F	N	F	F	F	F	10
143 619716		D6D-	PER	46		S	S	F	S	F	F	F	F	10
146 619416	CHIBUJILLO (SUCCHA)	D6D-744	PER	38		S	S	F	S	F	F	I	N	10
197 619678		D6D-1028	PER	40		S	S	F	S	F	F	I	F	10
190 619555		D6D-676	PER	28		S	S	F	S	F	F	I	F	10
152 619679		D6D-975	PER	63		S	S	F	N	F	F	I	F	10
195 619597		D6D-722	PER	58		S	S	F	N	F	F	I	N	10
168 619465		D6D-800	PER	46		S	S	F	N	F	F	F	N	10
169 619466		D6D-801	PER	39		S	S	F	N	F	F	F	N	10
149 619575		D6D-920	PER	24		S	F	F	S	F	F	F	F	10
178 619579		D6D-702	PER	49		S	F	F	S	I	F	I	S	10

TABLA 2 CODIFICACION DE VARIABLES

TRT		Tratamiento
NUM	G	Codificación Banco de Germoplasma
COD	IDEN	Código de identificación
ORI		Origen (lugar de procedencia)
T S		Tamaño de Semilla (peso en gramos de 100 semillas)
H C	-	Habito de Crecimiento
RUB		Rubisco
SKDH		Dehidrogena Shikímica
ME		Enzima Mállica
MDH		Malato dehidrogenasa
EST	"	Esterasa
PX		Peroxidasa
DIA		Diaforasa
SG		Subgrupo

TABLA 3 CODIGO DE LUGAR DE PROCEDENCIA

BZL	Brasil	LBN	Libano
CDA	Canadá	MEX	Mexico
CIA	Centro Internacional de Agricultura Tropical	Mich	Universidad del estado de Michigan
CLB	Colombia	NCA	Nicaragua
CLE	Chile	NLD	Nederlans Holanda
CRA	Costa Rica	PER	Peru
DOM	Republica Dominicana	PRI	Puerto Rico
ECA	Ecuador	RWA	Ruanda
ELS	El Salvador	SWA	Suecia
GTA	Guatemala	TKY	Turquia
HDR	Honduras	USA	Estados Unidos
IND	India	ZBA	Zambia
ITL	Italia		

TABLE 4 CODIFICACION DE PATRONES ISOENZIMATICOS

D1a	S = 1	(PX, MDH, EST)	S = 1
	F = 2		F = 2
	N = 3		I = 3
	U = 4		
	U/S = 5		
ACP	S = 1	(ME, Rubisco, SKDH)	S = 1
	F = 2		F = 2
	N = 3		

---

FIGURA 1 DENDOGRAMA

SEMI PARCIAL RAIZ CUADRADA

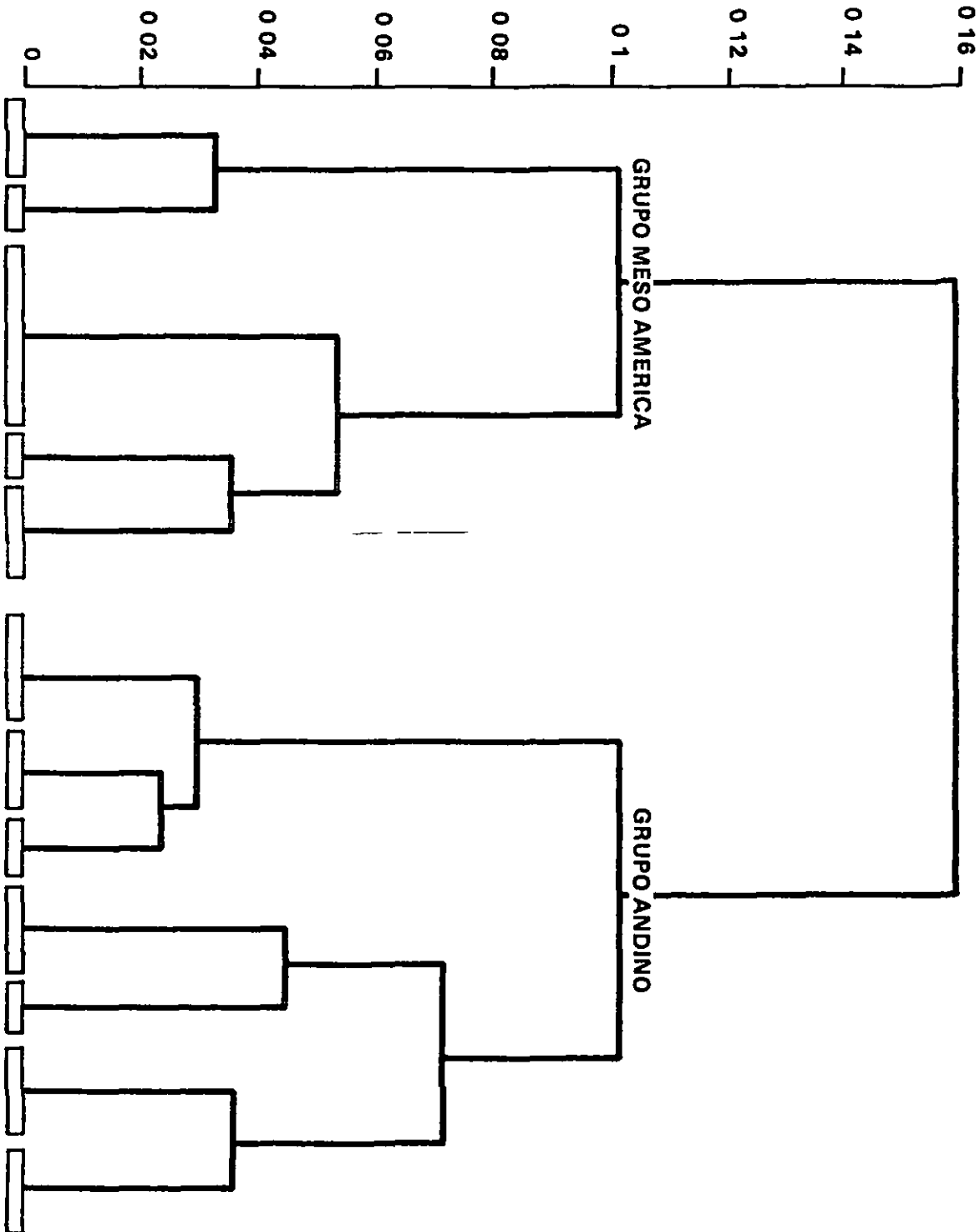


FIGURA 2 VARIABILIDAD GENETICA DE P vulgaris L ,

A*	1	G	1741	B*	1	BAT 477	C*	1	G	1741
	2		BAT 477		2	A 195		2,3		2295
	3		A 195		3	2097		4		2097
	4		2097		4	2111		5		2111
	5		2111		5,6,7	2098		6-8		2098
	6,7,8		2098		8,9	2295		9		A 195
	9,10		2295							

## A\* PEROXIDASA (PX)

- 1,2,y 3 ( P vulgaris doméstico)  
 4-8 ( P vulgaris silvestre de Costa Rica)  
 9 y 10 ( P vulgaris silvestre de Peru)

Esta enzima presenta un par de bandas en la zona 1, las cuales son constantes en el frijol domesticado, lo mismo que la accesión proveniente del Peru Mientras que las accesiones silvestres 2097, 2111 y 2098 (6), procedentes de Costa Rica presentan un par de bandas más rápido Las muestras (7 y 8) de la accesión 2098 presentan un patrón que contiene ambos tipos

## B\* FOSFATASA ACIDA (ACP)

- 1 y 2 ( P vulgaris doméstico)  
 3-7 ( P vulgaris silvestre de Costa Rica)  
 8 y 9 ( P vulgaris silvestre de Peru)

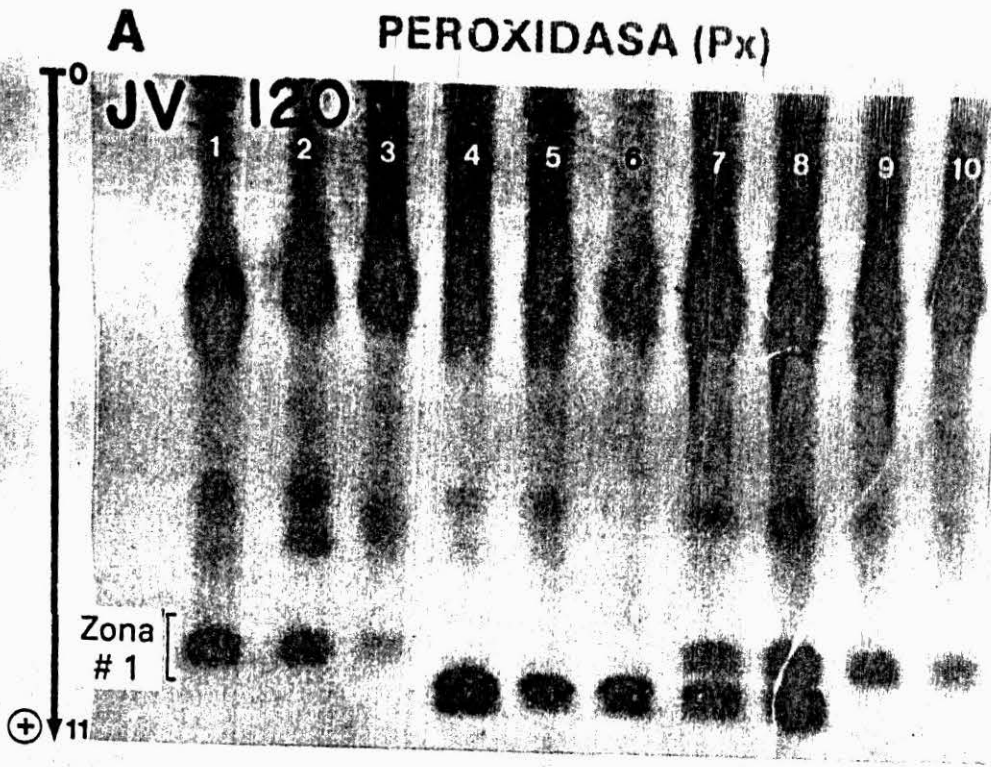
Dicha enzima presenta los patrones encontrados en el silvestre Peruano de semilla pequeña y en los peruanos domesticados con semilla mediana-grande (ver el texto)

## C\*- TRANSAMINASA GLUTAMICA OXALOACETICA (GOT)

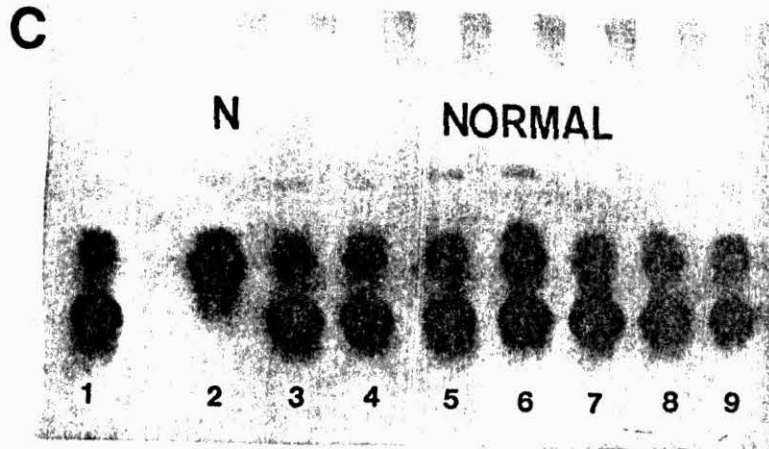
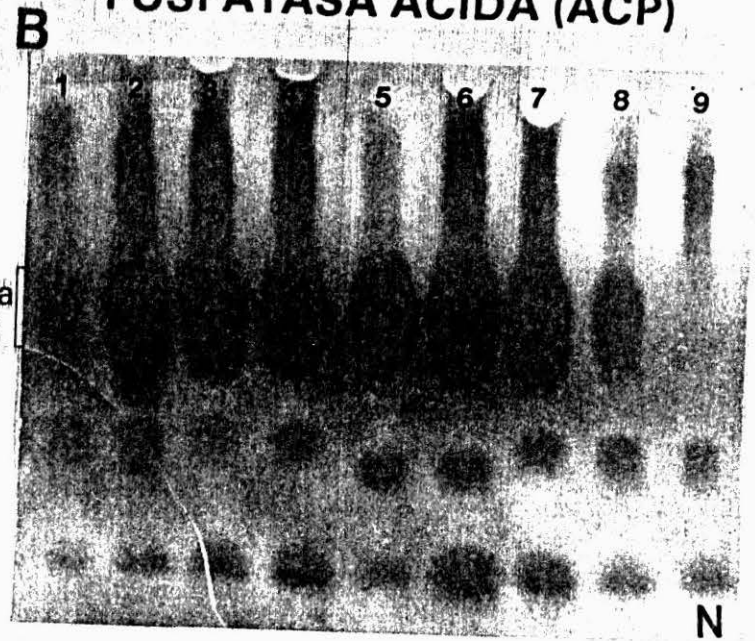
- 1 y 6 ( P vulgaris doméstico)  
 2 y 3 ( P vulgaris silvestre de Peru)  
 4-8 ( P vulgaris silvestre de Costa Rica)

La gráfica presenta el patrón encontrado tanto en el silvestre Peruano de semilla pequeña accesión 2295 (2) y los domesticados de semilla mediana-grande procedentes del Peru (ver texto)

**PEROXIDASA (Px)**



**FOSFATASA ACIDA (ACP)**



**TRANSAMINASA GLUTAMICA  
OXALOACETICA (GOT)**



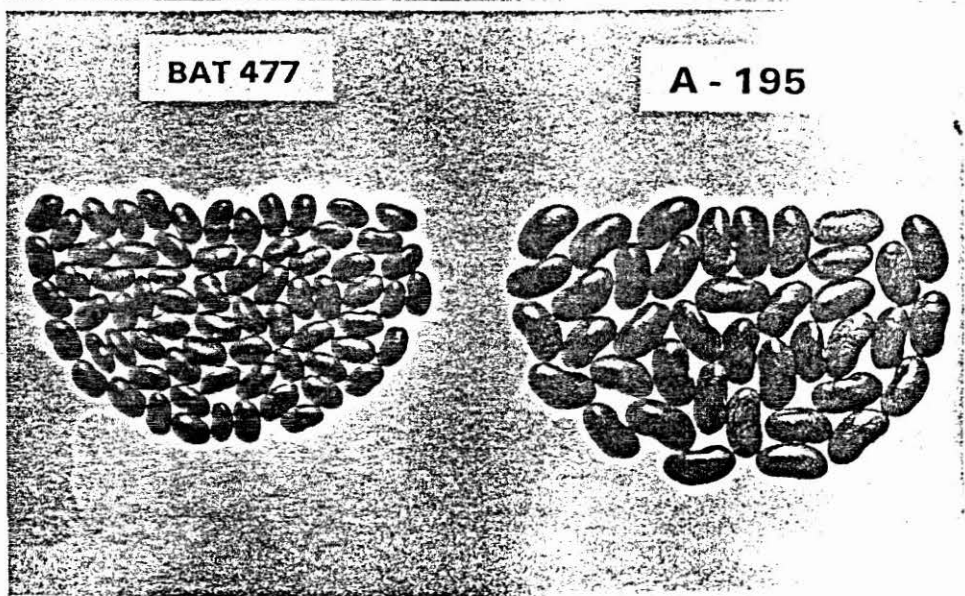


FIGURA 3 REPRESENTANTES DE LOS DOS CENTROS DE  
DOMESTICACION PRIMARIA EN FRIJOL

FIGURA 4 PATRON ISOENZIMATICO DE ( $\alpha$ , $\beta$  EST) EN P  
vulgaris L., DOMESTICO

1	G	1741	8	G	14016
2	G	57	9	G	4827
3	G	404	10	G	5273
4	G	1892	11	G	5472
5	G	3648	12	G	9603
6	G	11402	13	G	456
7	G	4489	14	G	13707

Las flechas indican la zona de actividad de la enzima con el sustrato  $\beta$  naftil acetato, observandose los patrones F, S e I., en la zona EST-1.

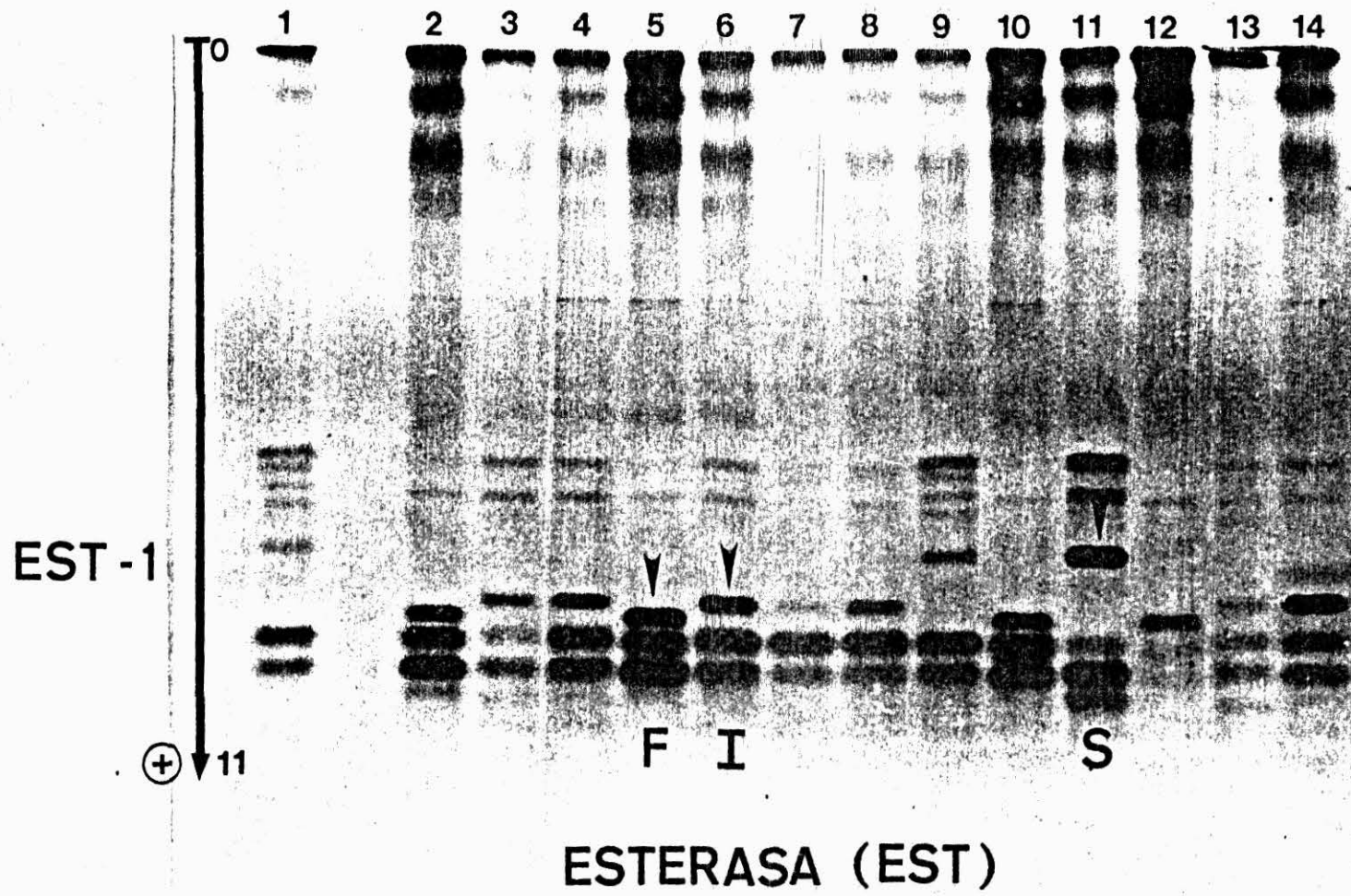


FIGURA 5 PATRONES DE VARIACION ISOENZIMATICA EN P vulgaris L.

A*	1	G	5773	B*	Patron en <u>P vulgaris</u> L.
	2	G	19643	1	G 1741
	3	G	623	2	G 5702
	4	G	4360	3	G 12709
	5	G	5711	4	G 18729
	6		2097	5	G 3353
	7		2111	6	G 3649
	8		2098	7	G 18446
	9		2295	8-10	2098
	10	G	19609	11-12	2295
	11	G	6223		
	12	G	9384		
	13	G	4470	B*	1-7 ( <u>P. vulgaris</u> L., doméstico)
	14	G	6099		8-12 ( <u>P. vulgaris</u> L., silvestre)
	15	G	4489		
	16	G	3645		

A\* 2-5 Y 10-16 ( P. vulgaris L., doméstico)  
6-9 ( P. vulgaris L., silvestre)

A\* DIAFORASA (DIA)

En la grafica se muestran los 5 patrones encontrados en fríjol.

- (F) presenta 4 bandas principales
- (S) presenta 5 bandas principales
- (U) presenta 6 bandas principales
- (N) presenta 1 ó 2 bandas principales, accesiones G 19643 y G 623
- (R) presenta 4 bandas principales con migración más lenta que el patrón (F)

B\* FOSFATASA ACIDA (ACP)

La grafica muestra el polimorfismo presentado por P vulgaris L.

- Zona 1 variación encontrada solamente en fríjol cultivado.
- Zona 2 variación encontrada solamente en fríjol silvestre procedente de Costa Rica accesion 2098 (8 y 9)
- Zona 3 la de mayor polimorfismo, con los patrones F, S y N (caracterizado por la ausencia de esta banda) encontrado en el fríjol cultivado y silvestre del Perú.
- Zona 4 se caracteriza por presentar los patrones S y F.

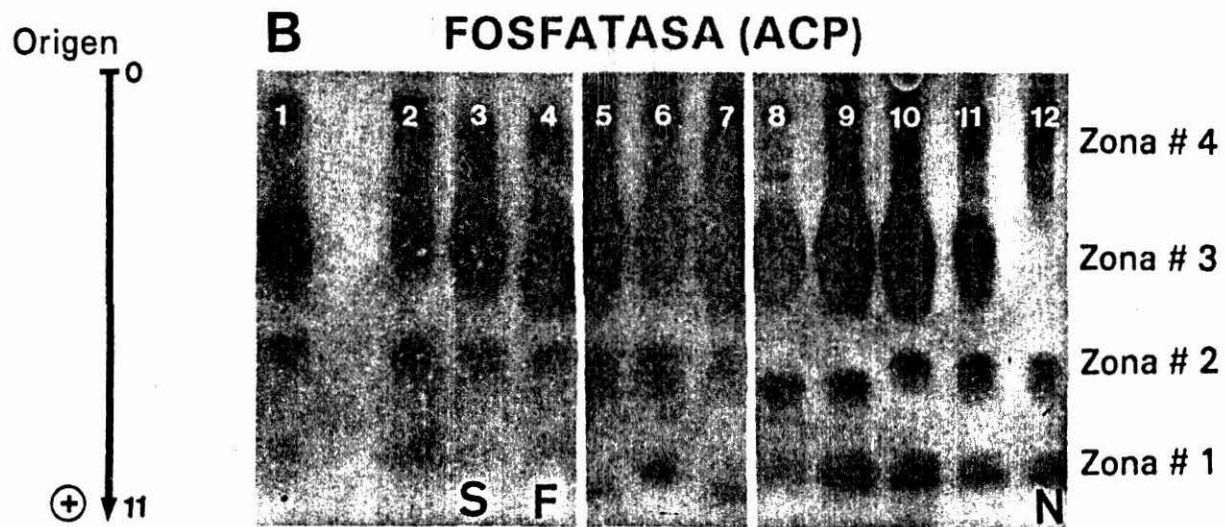
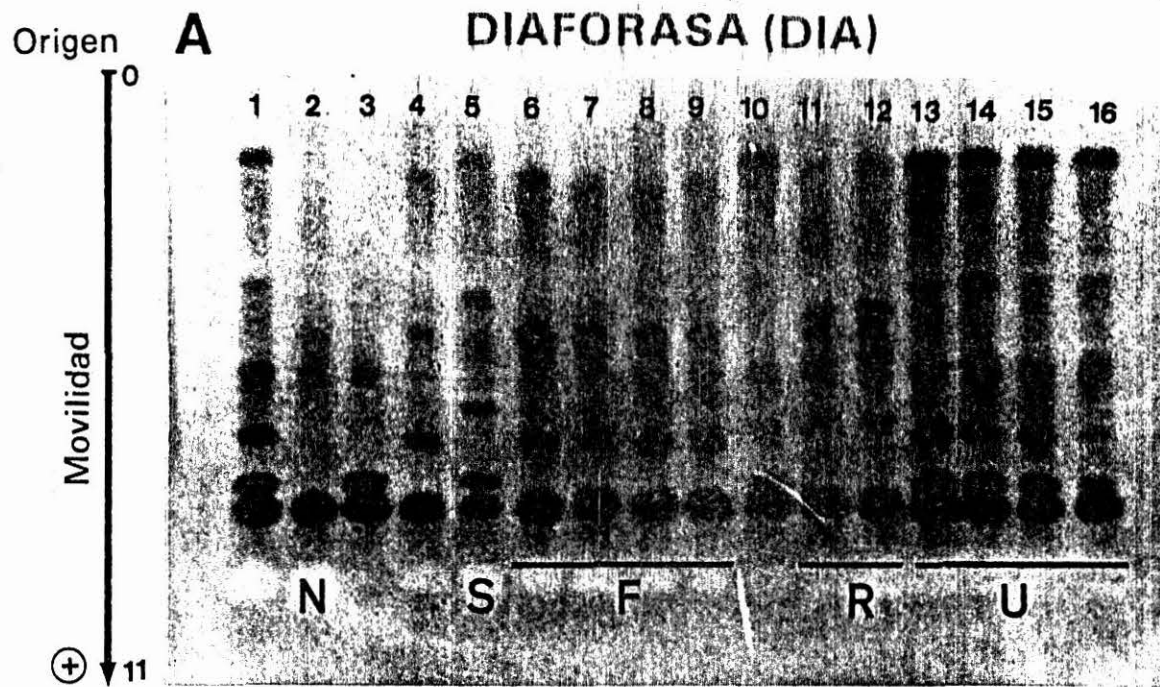


FIGURA 5 PATRONES DE VARIACION ISOENZIMATICA EN P  
vulgaris L

C*	1	G	1741	D*	1	G	1741	E*	1	G	1741
	2	G	6415		2	G	5773		2	G	4495
	3	G	76		3	G	19479		3	G	4000
	4	G	5165		4	G	19379		4	G	19643
	5	G	4017		5	G	19466		5	G	19609
	6	G	5899		6	G	577		6	G	8108
	7	G	4449		7	G	3807		7	G	19575
	8	G	6271		8	G	45		8	G	19379
	9	G	13739		9	G	19695		9	G	19466

C\* PEROXIDASA (PX)

En esta enzima se encontró los patrones de F, S e I en la movilidad hacia el cátodo, siendo más estable en esta zona las isoenzimas que migran hacia el ánodo

D\* MALATO DEHIDROGENASA (MDH)

Solamente presenta migración hacia el ánodo, encontrándose los patrones F, S e I

E\* ENZIMA MALICA (ME)

Presenta los patrones de migración hacia el ánodo F y S

#### 4 CONCLUSIONES

##### 4.1 Phaseolus vulgaris L , doméstico

La utilización de la variabilidad de los patrones isoenzimáticos como marcadores moleculares nos permite definir más estrechamente la variabilidad genética de las accesiones estudiadas para la formación de grupos génicos en el caso de Phaseolus vulgaris L , doméstico

Los resultados indican que al menos para ocho sistemas isoenzimáticos, existe algo de variabilidad. Se obtuvieron 2 grandes grupos principales, caracterizado cada uno de ellos por la dominancia de un patrón de Diaforasa (DIA). En el centro de domesticación de Meso America se encontró que el 59.2% del patrón (S) de DIA predomina sobre el patrón (F y U) y en el centro de domesticación Andino, el 70.7% de las accesiones son (F) para el patrón de DIA, predominando sobre el patrón (S)

En el centro de domesticación de Meso America los subgrupos 1 y 2 son el 82.6% del patrón (U) dominando sobre los patrones (N y F) de DIA y en el centro de domesticación Andino se encuentra la dominancia del patrón (F) sobre los patrones (S y N) en cada uno de los subgrupos

Igualmente se encuentran otros patrones isoenzimáticos que predominan en ambos grupos y que están marcando ciertos subgrupos. Es el caso de los patrones (N y S) de EST en los subgrupos 4 y 8 respectivamente, el patrón (N) de ACP en el subgrupo 7, el patrón (I) de PX en los subgrupos 7 y 8

No se puede dar ninguna explicación para las accesiones que tienen un patrón de DIA diferente al subgrupo en que están ubicados, considerándose a DIA como la enzima que marca un patrón de distribución geográfica en el germoplasma de frijol

El hecho de encontrar accesiones del material colectado en el Departamento de Cajamarca, dentro de todos los subgrupos, a excepción del subgrupo 4, no permite dar



como regla que las accesiones nativas son en realidad introducción de otras áreas

Con el desconocimiento de la variabilidad genética manifestado por la "diversidad" de los patrones isoenzimáticos de la forma silvestre ancestral, no podemos hacer correlaciones en cuanto a la reducción ó no de la diversidad genética del germoplasma de frijol y por tal razón no podemos estudiar las diferencias genéticas entre las dos formas y los cambios que han ocurrido para llegar de una forma a la otra. Lo mismo que el efecto que haya podido tener la domesticación sobre la variabilidad genética (estructura genética) en la consecuente formación de grupos genéticos como los aquí encontrados

Una pregunta que se haría es a nivel bioquímico (isoenzimas) la domesticación ha inducido una reducción de la diversidad genética?, lo que sí es contrastante con el aumento de la diversidad para características morfológicas

Un estudio sobre el tipo de faseolina es indispensable para ayudar a aumentar la claridad de estos análisis, en

especial para las accesiones con un patrón de DIA que se encuentran ubicadas en un grupo diferente al que deberían pertenecer por su lugar de origen También ayudaría a aclarar la relación de las accesiones que son (N) para la enzima ACP con el centro de domesticación Andino Y los (U) de DIA en el centro de domesticación de Meso América

En el presente trabajo se reporta la presencia del patrón (N) de DIA en accesiones Peruanas, dicho patrón fué previamente reportado por Sprecher (comunicación personal), en germoplasma de Turquía

#### 4 2 Phaseolus vulgaris L , SILVESTRE

Por no ser una muestra representativa en este análisis preliminar se puede decir que

- Existe variabilidad entre las accesiones
- Hay variabilidad en un mismo sitio de colección
- Se presenta variabilidad de los patrones

isoenzimáticos entre sitios de colección

- Se presenta similitud del patrón de DIA en los dos sitios de colección

## RECOMENDACIONES

Phaseolus vulgaris L , doméstico

- Estudiar mas accesiones Colombianas tipo IV para observar si presentan la misma variabilidad como la existente en las accesiones Peruanas
  
- Explorar la posibilidad de usar la colección de Cajamarca en cruces para ampliar la base genética de los frijoles volubles Colombianos tipo IV, en primera instancia, y posteriormente usarlos en cruces con frijoles tipo II o III de Meso America, para ampliar la base genética
  
- Determinar el tipo de faseolina de los patrones (U,N) de Diaforasa y (N) de Fosfatasa Acida

- Determinar la genética de DIA, ACP y otras enzimas

Phaseolus vulgaris L , silvestre

- Por las grandes perspectivas que ofrecen las formas silvestres de poseer genes de resistencia a gorgojos que dañan los granos almacenados, según lo reportado por Schoonhoven et al (1983), Cardona y Posso (1987), se recomienda a nivel de preservación

- 
- Colectar el mayor número de semillas de un mismo sitio
  
  - Incrementar todas las semillas que se colecten, con el fin de preservar la fuente de variabilidad presentada
  
  - Estudiar el patrón de DIA en Phaseolus vulgaris L , silvestre para observar si existe una distribución geográfica, como lo manifestado por Phaseolus vulgaris L , doméstico y mirar que relación tiene con el tipo de faseolina

## Recursos Genéticos

La variabilidad de los patrones isoenzimáticos encontrada en los diferentes subgrupos trae como consecuencia su conservación con igual prioridad. Un ejemplo es la alta variabilidad encontrada en material proveniente de Cajamarca, Peru entonces se aconseja estudiar a nivel bioquímico (isoenzimas), para conocer la estructura genética de este reservorio génico, del cual no se conoce nada, y crear políticas para su conservación ex situ e in situ.

- 
- Se recomienda un estudio a nivel isoenzimático de las formas silvestres con el objeto de conocer su variabilidad y estudiar la estructura genética de este reservorio, y su conservación ex situ e in situ.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fué caracterizar electroforéticamente 175 accesiones de Phaseolus vulgaris L , doméstico de diferentes partes del mundo, mediante la variabilidad de los patrones de migración de los sistemas isoenzimáticos (ACP, DIA, EST, MDH, ME, PX, RUBISCO y SKDH), en tejidos de raíz y hoja

---

La información obtenida se codificó y procesó por el metodo de minima varianza, obteniendose dos grupos principales el centro de domesticación de Meso America como grupo I, caracterizado por presentar accesiones de semilla pequeña y un 59 2% el patrón de Diaforasa (DIA), (S) y el centro de domesticación Andino como grupo II, presenta accesiones con semilla mediana-grande y un 70 7% tienen el patrón de Diaforasa (F) Además se encontró 5 subgrupos para cada uno de los grupos con un patrón de Diaforasa caracteristico y la presencia de otros patrones isoenzimáticos que marcan ciertos subgrupos

Además se encontró que existen accesiones con un patrón

de DIA diferente al cual están ubicadas es el caso de las accesiones procedentes del Departamento de Cajamarca Peru, requiriendose del estudio del tipo de faseolina para aclarar dichas relaciones

Se estudiarón, a nivel preliminar, accesiones de Phaseolus vulgaris L , silvestre, procedente de Costa Rica y Peru, encontrandose que tienen el mismo patrón de DIA y diferente patrón de Peroxidasa (PX), entre las accesiones y entre el germoplasma de Phaseolus vulgaris L , domestico

---

---



## SUMMARY

The objective of this work is to characterize by the use of electrophoresis 175 accessions of cultivated Phaseolus vulgaris L from different parts of the world. The variability for the following isozymes (ACP, DIA,  $\alpha, \beta$  EST, MDH, ME, PX, RUBISCO and SKDH) has been studied in leaf and root tissues.

The data have been codified and treated by a minimum variance analysis. It resulted in two principal groups: the center of domestication in Meso America, classified as group I, offers small seeded accessions and displays in 59.2% a slow (S) pattern in Diaphorase (DIA). While the center of domestication in the Andes, classified as group II, offers medium to large seeded accessions and displays in 70.7% a fast (F) of DIA. Moreover, 5 subgroups were identified within each group, with a special pattern of DIA, as well as other enzyme patterns.

The accessions from Cajamarca, Peru, display an atypical DIA pattern which does not correspond to the subgroups.

in which they should fall. A further study on phaseolin types is thus needed.

A few wild accessions from Costa Rica and Peru were studied in a preliminary step. They displayed the same pattern of DIA and a different pattern of PX in comparison to the accessions of Phaseolus vulgaris tested in this study.

## BIBLIOGRAFIA

Bassiri, A and Adams, M W (1978a) An electrophoretic survey of seedling isozymes in several Phaseolus species *Euphytica* 27 447-459

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ (1978b) Evaluation of common bean cultivar based on isoenzyme patterns *Euphytica* 27 707-720

Bliss, F A and Brown, J W S (1983) Breeding common bean for improved quantity and quality of seed protein In Janick, J, (ed), Plant Breeding reviews vol 1 pp 59-102, AVIPublishing Co Inc, Wesport

Boulter, D, Thurman, D A and Derbyshire, E (1967) A disc-electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytol* 66 27-36

Brown, J W S McFerson, J R, Bliss, F A and Hall, T C (1982) Genetic divergence among comercial classes of Phaseolus vulgaris in relation to phaseolin protein *HortScience* 17 752-754

\_\_\_\_\_, Ma, Y, Bliss, F A, Hall, T C (1981) Genetic variation in the subunits of globulin-1 storage protein of french bean *Theor Appl Genest* 59 83-88

Cardona, C Posso, C E, (1987) Bean varietal resistance to stored grain weevils sources, nechanisms and factors of resistance *Bean Newsl* 9(2) 1-4

Coyne, D P (1965) A genetic study of crippled morphology resembling virus symptoms in Phaseolus vulgaris L *J Hered* 56 162-176

Debouck, D G Hidalgo, R (1985) Morfologia de la planta de frijol comun En Lopez, M, Fernandez, F, Van Schoonhoven, A (eds), Frijol Investigación y Producción PNUD, CIAT, pp7-41, Cali Colombia

- \_\_\_\_\_ (1985-1986) Phaseolus Germplasm collection in Cajamarca and Amazonas, Peru Informe de viaje, Mayo 9 - Junio 20 de 1985 y Julio 29 - Agosto 26 de 1986, 38 pag mimeografiado
- \_\_\_\_\_ Gonzalez, W G , Araya, R , Tohme, J (1988) Presencia de formas silvestres de Phaseolus vulgaris L en Costa Rica (En Prensa)
- Derbyshire, E , Yarwood, J N , Neat, E , Boulter, D (1976) Seed proteins of Phaseolus and Vigna New Phytol 66 27-36
- Evans, A M (1976) Beans In Simmonds, N W (ed ) Evolution of Crop Plants, p 168-172 Longman, London
- Freytag, G F (1965) Clasificacion del frijol comun (Phaseolus vulgaris L ) y especies afines Ceiba (Honduras) 11 51-64
- Gentry, H S (1969) Origen of the common bean Phaseolus vulgaris Econ Bot 23 55-69
- \_\_\_\_\_ Gepts, P (1984) Nutritional and evolutionary implications of phaseolin seed protein variability in common bean (Phaseolus vulgaris L ) Ph D Tesis Madison, University of Wisconsin 222p
- \_\_\_\_\_ Bliss, F A (1985) F<sub>1</sub> hybrids weakness in the common bean The Journal of Heredity 76 447-450
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ (1986a) Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (Phaseolus vulgaris) from Colombia Econ Bot 40 469-478
- \_\_\_\_\_ Osborn, T C , RASHKA, k , Bliss, F A (1986b) Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (Phaseolus vulgaris) evidence for multiple centers of domestication Econ Bot 40 451-468
- Gottlieb, L D (1973) Enzyme differentiation and phylogeny in Clarkia franciscana C. ricunda and C. amoena Evolution 27 205-214
- Harris, H , Hopkinson, D A (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics North-Holland Publishing Co , Amsterdam
- Laemmli, U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

T4 Nature 227 680-685

- Ma, Y , Bliss, F A (1978) Seed proteins of common bean  
Crop Science, 18 431-437
- Maréchal, R , Mascherpa, J M , Stainier, F (1978) Etude  
taxonomique d' un groupe complexe d' espèces  
des genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur  
la base de données morphologiques et polliniques,  
traiteés par l' analyse informatique Boissiera  
28 1-273
- SAS Institute Inc (1985) User's Guide Statistics  
Version 5 Cary, NC SAS Institute Inc, 956 pp
- Scandalios, J G (1969) Genetic control of multiple  
molecular forms of enzymes in plants A Review  
Biochemical Genetics 3 37-79
- Schoonhoven, A V , Cardona, C , Valor, J (1983)  
Resistance to the Bean Weevil and the Mexican  
Bean Weevil (Coleoptera Bruchidae) in non  
cultivated common bean accessions J Econ  
Entomol 76(6) 1255-1259
- Shii, C T , Mok, C M , Temple, S R , Mok, D W S (1980)  
Expresion of developmetal abnormalities in  
hybrids of Phaseolus vulgaris L J Heredity  
71 218-222
- Singh, S P (1982) A key for identification of  
different growth habits of Phaseolus vulgaris L  
Ann Rept Bean Impr Coop 25 92-94
- \_\_\_\_\_ Gutiérrez, A J (1984) Geografical  
distribution of the DL1 and DL2 genes causing  
hybrid Dwarfism in Phaseolus vulgaris L , their  
association with seed size and their significance  
to breeding Euphytica 33 337-345
- \_\_\_\_\_ (1988) Gene pools in cultivated dry bean Ann  
Rept Bean Imp Coop 31 180-1882
- Sprecher, S L (1988) Isozyme genotype differences  
between the large seeded and small seeded gene  
pools in Phaseolus vulgaris L Ann Repot Bean  
Impro Coop 31
- Wall, J R , Wall, S W (1975) Isozyme polimorphisms in  
the study of evolution in the Phaseolus vulgaris  
- Phaseolus coccineus complex of Mexico In  
Markert, C L (ed ), Isozymes IV Genetics and

evolution pp 287-305 Academic Press Inc New York

Ward, J H , (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function J of the American Statistical Association 77 841-847

Weeden, N F (1983) Variation at isozyme loci in Phaseolus vulgaris Ann rept Bean Imp Coop 26 102-103

\_\_\_\_\_ (1984) Distinguishing among White seeded bean cultivars by means of allozyme genotypes Euphytica 33 199-208

\_\_\_\_\_ Gottlieb, L D (1980) Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucoisomerases by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues Biochem Genet 17 287-296

West, N B , Garbert, D E (1967) Genetics studies of variant enzymes, I on electrophoretic survey of esterases and Leucine aminopeptidases in the genus Phaseolus Can J Genetic Cytol 9-640-645 \_\_\_\_\_

ANEXO 1 Tejido, Enzima y Protocolo de tinción

1 - Raiz

DEHIDROGENASA SHIKIMICA (SKDH) E C 1 1 1 25

Tris-Hcl 1M pH 8 5	5 ml
ácido Shikimico	20 mg
NADP	5 mg
MTT	5 mg
PMS	1 mg
Agua	25 ml

DIAFORASA (Dia) E C 1 6 4 3

Tris-Hcl 1M pH 8 5	5 ml
NADH	10 mg
2,6 Diclorofenol indofenol	1 mg
MTT	10 mg
Agua	35 ml

ESTERASA (EST) E C 3 1 1 1

Solución fosfato de sodio 0 2M pH 6 8	200 ml
alfa Naftil acetato	100 mg
Beta naftil acetato	100 mg
(disolver en 5 ml de acetona)	
Sal de Fast Garnet	100 mg

PEROXIDASA (PX) E C 1 1 11 7

Acetato de sodio 0 2 M	50 ml
3-amino 9-etil carbazol	30 mg
(disolver en 5 ml de NN dimetil formamida)	
Peróxido de hidrogeno	5 gotas

2 - Hoja

ENZIMA MALICA (ME) E C 1 1 1 40

Tris-Malato 0 1 M pH 7 2	25 ml
L-ácido málico	10 mg
NADP	5 mg
PMS	5 mg

FOSFATASA ACIDA (ACP) E C 3 1 3 2

Acetato de sodio 0 1 M pH 5 0	30 ml
-------------------------------	-------

ANEXO 1 CONTINUACION

Alfa fosfato ácido de naftilo	30 mg
Beta fosfato ácido de naftilo	30 ml
Sal de Fast Garnet GBC colorante	30 mg

MALATO DEHIDROGENASA (MDH) E C 1 1 1 37

Tris-Malato 0 1 M pH 7 2	25 ml
ácido Málico	10 mg
NAD	10 mg
MTT	5 mg
PMS	1 mg

RUBISCO (Proteína)

Azul Negro de Naftol	25 mg
Solución de lavado	50 ml
(Metanol Agua ácido acético 5 5 1)	

TRANSAMINASA GLUTAMICA OXALOACETICA (GOT)  
E C 2 6 1 1

Tris-HCL 1M pH 8 0	5 ml
L-ácido aspartico	60 mg
ácido alfa cetoglutarico	30 mg
Piridoxal-5-fosfato	5 mg
Sal azul Fast BB	30 mg