

DETERMINACION DE LAS RELACIONES GENETICAS EN 24 ACCESIONES DE FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris*)^{*1}

Determination of genetic relationships among 24 collections of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

Martha Leticia Gutiérrez C.², Gustavo Ligarreto M.³, Orlando Martínez W.⁴ y Luz Marina Reyes C.⁵

RESUMEN

Se caracterizaron 24 accesiones de *Phaseolus vulgaris* L., de las cuales 21 son de origen andino y tres mesoamericanas. Dentro de los materiales andinos, se incluyeron variedades mejoradas y cultivariedades regionales, procedentes de diversas zonas agroecológicas de Colombia. Para la caracterización, se utilizaron 22 sistemas isoenzimáticos, ocho de los cuales mostraron buena resolución y fueron seleccionados como marcadores bioquímicos del estudio. Seis enzimas revelaron polimorfismos: Esterasa (EST), Malato deshidrogenasa (MDH), Deshidrogenasa Shikímica (SKDH), Rubisco (RBCS), Isocitrato deshidrogenasa (IDH), y Glutamato deshidrogenasa (GDH). Las enzimas: Transaminasa glutámica oxalacética (GOT) y Endopeptidasa (EP) fueron monomórficas para todas las accesiones estudiadas. El polimorfismo se evidenció a través de 17 loci que codificaron para un mí-

nimo de 34 alelos diferentes. Las enzimas IDH y GDH se reportan por primera vez en el frijol común. Para establecer las relaciones entre los grupos, se usó la distancia de Jaccard y el algoritmo de agrupación UPGMA. El dendrograma obtenido conjugó dos grupos divididos en cinco subgrupos. Los grupos principales se separaron en primera instancia por el centro de domesticación: el mesoamericano y el andino, como era de esperarse. Los tres testigos mesoamericanos fueron separados del resto en un subgrupo. Las poblaciones andinas colombianas, en las cuales se centró la importancia de este estudio, fueron divididas en cuatro subgrupos que no discriminaron, en forma marcada las variedades mejoradas de las cultivariedades regionales. Los subgrupos se analizaron y discutieron de acuerdo con sus genealogías, orígenes geográficos y lugares de adaptación, más que por sus características morfológicas.

Palabras claves: Acervos genéticos, diversidad bioquímica, germoplasma vegetal.

* Recibido en Septiembre de 1998.

1. Contribución del Programa Nacional de Recursos Genéticos Vegetales de CORPOICA y la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.
2. Bióloga, Universidad de los Andes. Bogotá.
3. Investigador, Programa Nacional Recursos Genéticos Vegetales. CORPOICA, CI-Tibatá.
4. Profesor titular Universidad Nacional Facultad de Agronomía, Bogotá.
5. Profesora Asociada Universidad Nacional. Facultad de Agronomía-Bogotá.

SUMMARY

Twenty four collections of common bean, 21 from Andean origin and three from Central America were characterized, using biochemical markers. Eight out of 22 isozyme systems showed good resolution. Six enzymes were polymorphic: Esterase (EST), Malate dehydrogenase (MDH), Shikimate dehydrogenase (SKDH), Rubisco (RBCS), Isocitrate dehydrogenase (IDH), and

Glutamate dehydrogenase (GDH). Two other two enzymes, Glutamate oxalacetate transaminase (GOT) for all accessions and Endopeptidase (EP), were monomorphic. A total of 17 loci were detected with at least 34 alleles. The enzymes IDH and GDH are reported the first time for the species. To define the relationships among the accessions, the Jaccard distance and the UPGMA procedures were used. The dendrogram displayed two main groups and five subgroups. The clusters were associated with the centers of species's domestication: Mesoamerica and the Andes, as it was expected. The relationships among the subgroups were analyzed and discussed according to the geographical origin, sites of adaptation and lineage, rather than to their morphological similarities.

Key words: biochemical diversity, genetic resources, plant germplasm.

INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie anual, diploide ($2n = 2x = 22$), originaria del hemisferio occidental y que posee muchas variedades cultivables. Las especies ancestrales y silvestres se distribuyen en una gran área geográfica, que ocupa desde el Norte de México hasta el noroeste de Argentina (Koenig y Gepts, 1989). El frijol fue domesticado en el Nuevo Mundo, probablemente, entre 8000 y 10.000 años atrás y está constituido por dos centros principales de domesticación: el Mesoamericano, que incluye las variedades de México, Centroamérica y algunas de Colombia y el Andino, el cual toma algunas variedades del Perú, y todas las de Argentina. Otras variedades, que comprenden el Sur de Colombia, Norte de Perú y del Ecuador, parecen ser la transición genética entre estos dos principales centros (Debouck *et al.*, 1993; Koenig y Gepts, 1989; Singh *et al.*, 1991 a y b; Gepts and Bliss, 1986; y Gepts *et al.*, 1986).

Siendo Colombia un punto importante de transición genética, además de ser un país donde el área de cultivo es extensa, se hace necesario el estudio de las diferencias

morfológicas, bioquímicas y moleculares entre las diferentes poblaciones cultivadas y regionales de la especie, para utilizar esta información en futuros programas de fitomejoramiento.

Las diferencias morfológicas y fisiológicas, aunque útiles, están sujetas a variaciones ambientales. Las técnicas de diferenciación molecular y bioquímica ofrecen ciertas ventajas, en cuanto a que las segundas ya que se ven poco afectadas por el medio y las primeras resultan totalmente exentas (Weeden, 1984).

Para estudiar diferencias bioquímicas, se utilizan proteínas totales e isoenzimas. Los métodos electroforéticos son los que proveen información cultivo-específica del bandeado isoenzimático o proteínico para detectar variabilidad y poder analizar la variabilidad genética de las variedades de la especie mediante estadísticos genético-poblacionales,

Entre los estudios que han utilizado isoenzimas para determinar diversidad genética y relaciones filogenéticas en las especies del género *Phaseolus* se tienen: Bassari y Adams (1978a) examinaron la variabilidad de tres isoenzimas: Peroxidasa, Esterasa y Fosfatasa ácida en 13 especies del género. La mayoría de las especies mostraron patrones únicos con las enzimas utilizadas, excepto las variedades silvestres y cultivadas de *P. vulgaris* y *P. coccineus*. Posteriormente Bassari y Adams (1978b) observaron la variabilidad en 34 variedades cultivadas y 19 comerciales y encontraron que las enzimas Peroxidasa y Esterasa eran buenos marcadores para identificar y estimar las relaciones inter e intra clases. Singh *et al.* (1991a, 1991b) usaron un gran número de variedades de *P. vulgaris* L. y determinaron los centros de domesticación de la especie.

Los objetivos para este estudio fueron: caracterizar bioquímicamente veinticuatro variedades colombianas de *P. vulgaris* L. de las cuales un grupo correspondió a materiales nativos y otro a variedades comerciales, y determinar la variabilidad genética presente en estas colecciones seleccionadas.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio, se utilizaron 24 colecciones del banco de germoplasma de frijol administrado por CORPOICA, de las cuales tres fueron de origen mesoamericano y 21 andinas. El grupo de origen andino estuvo constituido por materiales regionales y mejorados (Cuadro 1).

La semilla se trató con hipoclorito de sodio (0,5%) para desinfectarla y se sembró en materos bajo condiciones de invernadero en el CI-Tibaitatá. Después 20 días de sembradas, se extrajeron las isoenzimas del tejido foliar joven (Vargas, 1988).

El sistema de extracción utilizado fue el indicado por Hussain *et al* (1986): Tris-malato pH 7,4 0,1M, Glicerol 20%, PVP-40 10%, Triton-100 5% y 2-Mercaptanol 14 μ M.

La proporción muestra/buffer que se estandarizó fue de 1/3. El proceso de extracción se mantuvo a 4°C para evitar la desnaturalización de las isoenzimas. Después de pesar la muestra (0,5 gr de hoja fresca) y agregar el buffer (1,5 ml), se maceró y se guardó en tubos eppendorf para centrifugar a 14.000 rpm, durante 30 minutos. La muestra se almacenó a muy bajas temperaturas (-70°C). El material puede guardarse hasta dos meses bajo estas condiciones y las cantidades pueden utilizarse para cinco o seis corridas.

Los ensayos preliminares se realizaron con 22 enzimas, de las cuales ocho presentaron buena resolución y repetibilidad y, por lo cual fueron seleccionadas como marcadores bioquímicos para este trabajo (Cuadro 2).

Cuadro 1. Variedades de *P. vulgaris* L. utilizadas en la caracterización mediante marcadores isoenzimáticos 1996.

| No. | VARIEDAD | CENTRO DOMESTICACION | TIPO DE MATERIAL |
|-----|------------------|----------------------|------------------|
| 1 | Italia 3 | Mesoamericano | Introducción |
| 2 | México 487 | Mesoamericano | Introducción |
| 3 | ICA Pijao | Mesoamericano | Mejorado |
| 4 | ICA Tundama | Andino | Mejorado |
| 5 | ICA Cerinza | Andino | Mejorado |
| 6 | Diacol Andino | Andino | Mejorado |
| 7 | ICA Bachue | Andino | Mejorado |
| 8 | Diacol Calima | Andino | Mejorado |
| 9 | ICA Rovirensense | Andino | Mejorado |
| 10 | Radical | Andino | Regional |
| 11 | Línea 34400 | Andino | Mejorado |
| 12 | ICA Guaitara | Andino | Mejorado |
| 13 | Blanco | Andino | Mejorado |
| 14 | Nariño 4 | Andino | Regional |
| 15 | Antioquía 8 | Andino | Regional |
| 16 | Antioquía 4 | Andino | Regional |
| 17 | Santander Sur 7 | Andino | Regional |
| 18 | Valle 4 | Andino | Regional |
| 19 | Ecuador 60 | Andino | Regional |
| 20 | Cauca 37 | Andino | Regional |
| 21 | Antioquia 9 | Andino | Regional |
| 22 | Magdalena 10 | Andino | Regional |
| 23 | Nariño 47 | Andino | Regional |
| 24 | Cuba 5 | Andino | Introducción |

Cuadro 2. Enzimas utilizadas en la caracterización bioquímica de 24 accesiones de frijol común (*P. vulgaris* L.) 1996.

| ENZIMAS | SIGLAS | CODIGO | CATEGORIA |
|---------------------------------------|---------|--------------|----------------|
| 1. Alfa y Beta Esterasas | EST | E.C.3.1.1.2 | Hidrolasa |
| 2. Malato Deshidrogenasa | MDH | E.C.1.1.1.37 | Deshidrogenasa |
| 3. Deshidrogenasa Shikímica | SKDH | E.C.1.1.1.25 | Oxidasa |
| 4. Isocitrato Deshidrogenasa | IDH | E.C.1.1.1.42 | Deshidrogenasa |
| 5. Ribulosa Bifosfato Carboxilasa | RUBISCO | E.C.4.1.1.39 | |
| 6. Transaminasa Glutámica Oxalacética | GOT | E.C.2.6.1.1 | Miscelánea |
| 7. Endopeptidasa | EP | E.C.3.4.22.1 | |
| 8. Glutamato Deshidrogenasa | GDH | E.C.1.4.1.2 | Deshidrogenasa |

La técnica de electroforesis que se utilizó para este estudio fue la Disc-PAGE, (electroforesis en geles de poliacrilamida en forma discontinua). Esta técnica utiliza dos geles, uno seguido del otro, cuya concentración y pH son diferentes: El primero de los geles es el gel concentrador o "staging" (está en contacto con las ranuras donde se siembran las muestras), tiene una baja concentración de poliacrilamida (4%) y está conformado por la solución de acrilamida 99%, buffer Tris HCL pH 6,8 0,5M, persulfato de amonio (10%) y TEMED. El segundo gel gel separador o "resolving" tiene una concentración de poliacrilamida del 6%, 8%, 10% o 12% según la enzima y comprende los mismos reactivos que el gel concentrador, excepto el buffer de Tris HCL pH 8,8. 1,5M.

Una vez preparados los geles, se dejaron refrigerar durante cuatro horas y, posteriormente, se sembraron 25 µl de muestra en cada casilla y se hicieron los montajes de los geles en el aparato refrigerador y se adicionó el buffer de electrodos: Tris Borato pH 9,0. La intensidad de la corriente que se le aplicó al gel, pudo variar sin afectar el corrimiento de las muestras; la corrida se inició con 50 voltios y, después, se fue aumentando de 50 en 50 cada media hora hasta llegar a un máximo de 250 voltios, en donde se mantuvo hasta que la muestra terminó de correr. Los reactivos y procedimientos de tinción para cada sistema isoenzimático fueron tomados de Hussain *et al.* (1986).

Los datos de todas las colecciones se agruparon en una matriz de presencias y au-

sencias (1 y 0, respectivamente) para cada zimograma de las enzimas polimórficas. Posteriormente, para cada par de accesiones (A y B), se calculó su distancia bioquímica (D_{AB}) mediante la siguiente expresión:

$$D_{AB} = 1 - S_{AB}$$

$$S_{AB} = a / (a + b + c) = \text{Coeficiente de Jaccard}$$

a = número de presencias en A y B simultáneamente

b = número de presencias en A

c = número de presencias en B

A partir de cada par de distancias, se construyó la matriz de distancias entre colecciones y se aplicó el algoritmo UPGMA para la construcción del dendrograma (Sneath y Sokal, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los ocho sistemas isoenzimáticos analizados mostraron un total de 17 loci, los cuales codificaron un mínimo de 34 alelos. Las enzimas que aportaron variabilidad fueron Esterasa y Malato Deshidrogenasa, siendo las más polimórficas, seguidas por Deshidrogenasa, Rubisco, Isocitrato Deshidrogenasa y Glutamato Deshidrogenasa (Cuadro 3).

El dendrograma separó dos grandes grupos, el primero de ellos reunió dos

Cuadro 3. Número de aloenzimas por locus detectadas en frijol (*P. vulgaris* L.) 1996.

| ENZIMAS | VARIABILIDAD | No. LOCI | No. ALELOS | ESTRUCTURA |
|--------------|--------------|-----------|------------|------------|
| EST | Polimórfica | 1 | 2 | Monómero |
| | | 2 | 5 | Monómero |
| | | 3 | 1 | |
| | | 4 | 4 | Monómero |
| MDH | Polimórfica | 1 | 3 | Monómero |
| | | 2 | - | |
| | | 3 | 2 | Monómero |
| SKDH | Polimórfica | 1 | 4 | Monómero |
| IDH | Polimórfica | 1 | 1 | |
| | | 2 | 3 | Monómero |
| RBCS | Polimórfica | 1 | 2 | |
| GDH | Polimórfica | 1 | 1 | |
| | | 2 | 2 | Monómero |
| | | 3 | 1 | |
| GOT | Monomórfica | 1 | 1 | |
| | | 2 | 1 | |
| EP | Monomórfica | 1 | 1 | |
| TOTAL | | 17 | 34 | |

subgrupos, 1 y 2. El segundo reunió tres subgrupos, 3; 4 y 5 más una variedad aislada (Fig. 1).

La primera separación genética que hizo el dendrograma confirma lo reportado por diferentes autores sobre los dos principales centros de domesticación del frijol común: discrimina claramente los de origen mesoamericano de aquellos de origen andino. Las variedades andinas procedentes del sur-occidente del país: ICA Bachue (7), Valle 4 (18) y Nariño 47 (23) se ubicaron en un subgrupo dentro de las mesoamericanas y su posición intermedia insinúa, claramente, que estas variedades pueden ser producto de hibridación entre los mesoamericanos y andinos, como lo sugieren Koenig y Gepts (1989), Claros *et al.*, (1993), Gepts *et al.* (1986) y Debouck *et al.* (1993) para las zonas sur-occidente de Colombia y norte de Perú y Ecuador.

A pesar de la gran diversidad morfológica en cuanto a forma, tamaño y color de la semilla, morfología de la planta, hábitos de crecimiento y resistencia a enfermedades presente en las 24 accesiones estu-

diadas, la diversidad genética detectada no fue muy amplia. En general los diferentes materiales se congregaron más por sus genealogías y lugares de adaptación, que por las similitudes morfológicas, así:

Subgrupo 1. Reunió a las tres variedades de origen mesoamericano Italia 3 (1), México 487 (2) e ICA Pijao (3). Se encontró gran homogeneidad para los ocho sistemas isoenzimáticos dentro del subgrupo, pero se podría indicar que este subgrupo presentó la mayor heterogeneidad a nivel intergrupar. ICA Pijao corresponde a una variedad mejorada, con considerable adaptación a la zona templada mesoamericana, y presentó un distanciamiento genético mayor al que expusieron Italia 3 y México 487.

Subgrupo 2. Este pertenece al primer gran grupo junto con los mesoamericanos. Conjugó las variedades andinas ICA Bachue (7), Valle 4 (18) y Nariño 47 (23). Las tres manifestaron adaptación al clima medio colombiano y provienen de la misma región de país; las variedades Valle 4 y Nariño 47, como su nombre lo indica, proceden del sur-occidente colombiano, y la variedad ICA Bachue

proviene del ICA Guzli, variedad oriunda del Valle del Cauca y de un progenitor antioqueño de origen andino (Ligarreto, 1996).

Subgrupo 3. Este subgrupo pertenece al segundo gran grupo, donde todas las variedades son andinas. El subgrupo 3 reunió a las siguientes variedades: Cerinza (5), Diacol Andino (6), Radical (10), Blanco (13), Cauca 37 (20), Antioquia 9 (21) y Cuba 5 (24) (Fig. 1). Las variedades Cerinza y Diacol Andino no presentaron divergencia alguna a nivel bioquímico y no variaron en ningún alelo y su distancia genética fue de cero. Sin embargo, morfológicamente, estas dos variedades son muy diferentes. La explicación de su alto grado de similaridad radica en sus ancestros, las dos son variedades mejoradas que provienen de cruces entre parentales antioqueños y, en su lugar de adaptación, las dos son variedades de amplia adaptación a las zonas productoras de frijol en el clima frío de Colombia y por ello, son las más sembradas en estos ambientes (Ligarreto, 1996).

Radical es otra variedad relativamente cercana genéticamente a las variedades Cerinza y Diacol Andino, con forma y tamaño de semilla similares. La variedad Blanco es una mutación para el color de ICA Cerinza y, por esta razón, se esperaba que se encontrara en el mismo subgrupo.

Las variedades Cauca 37, Antioquia 9 y Cuba 5 no mostraron variabilidad en los ocho sistemas isoenzimáticos analizados y las distancias genéticas entre los tres fueron de magnitud cero. Antioquia 9 y Cuba 5 presentan morfología similar en cuanto al color de la semilla y la flor. Las variedades Cauca 37 y Cuba 5, también, coinciden en algunas características morfológicas, como tamaño y forma de la semilla. Las más diferentes a nivel morfológico fueron Antioquia 9 y Cauca 37, aunque, presentaron resistencia a enfermedades como Roya y Antracnosis. La genealogía de las tres accesiones es diferente, sobre todo la de Cuba 5. El factor que parece unir las tres es la adaptación que todas poseen a

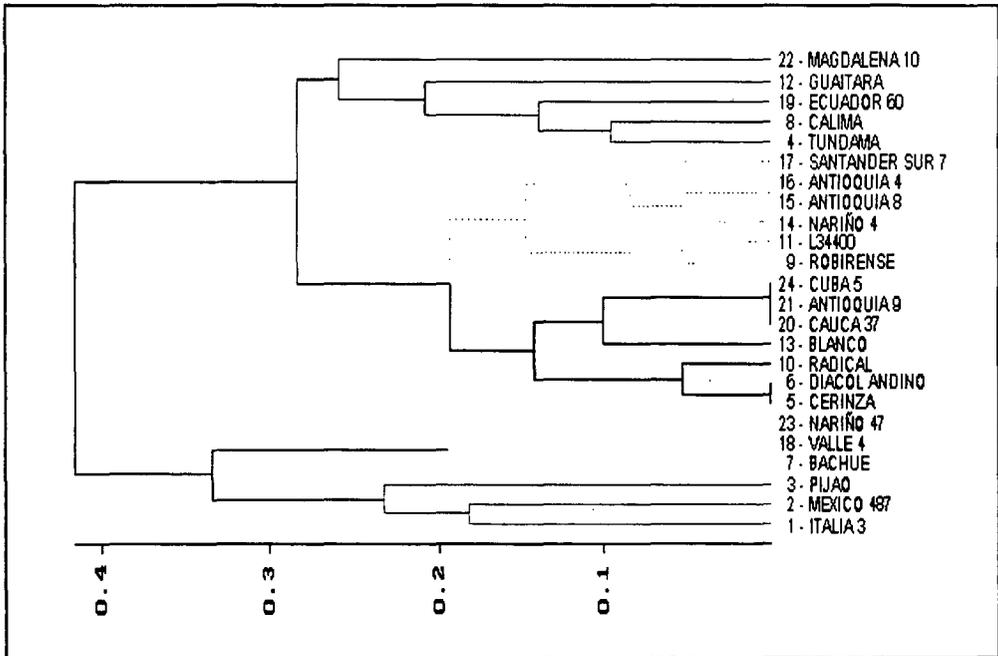


Figura 1. Dendrograma utilizando distancias de Jaccard para establecer relaciones filogenéticas en 24 accesiones de frijol común

la zona cafetera Colombiana (Ligarreto, 1996). Esto puede incidir a que presenten las mismas isoformas. Además, otro factor que une al subgrupo es que, en general, todas las semillas tienen colores que van dentro de las tonalidades rojas y cremas moteadas con rojo.

Subgrupo 4. Enmarcado dentro del segundo gran grupo y aglomeró las siguientes variedades: ICA Rovirense (9), Línea 34400 (11), Nariño 4 (14), Antioquia 8 (15), Antioquia 4 (16) y Santander Sur 7 (17) (Fig. 1).

Las variedades Rovirense y L-34400 descendientes de las variedades Radical mejorada e ICA Cerinza, respectivamente, presentan similares ancestros (Radical mejorada e ICA Cerinza pertenecen al mismo subgrupo 3) y comparten algunos rasgos morfológicos, como el color rojo y forma ovoidal de la semilla.

Las accesiones Nariño 4, Antioquia 8, Antioquia 4 y Santander Sur 7 se agruparon muy cerca, debido a sus cortas distancias genéticas. Las dos Antioquia tuvieron una distancia genética de magnitud igual a cero y este resultado coincidió con lo esperado, ya que se trata de dos variedades de la misma localidad y origen, aunque su morfología sea diferente. Las características morfológicas en semilla de las variedades Nariño 4 y Santander Sur 7 son similares a las Antioquia. Las cuatro accesiones tienen resistencia similar a las enfermedades que, comúnmente, atacan al frijol: Roya, Antracnosis y Oidium. Las cuatro accesiones están congregadas en este subgrupo, posiblemente, a que son adaptativas a la zona alta cafetera colombiana (Ligarreto, 1996).

Subgrupo 5. Último subgrupo dentro del segundo gran grupo y reunió cuatro variedades: ICA Tundama (4), Calima (8), Ecuador 60 (19) e ICA Guaitara (12) (Fig. 1). En este subgrupo, las variedades Tundama y Calima fueron las de distancias genéticas más cercanas, sus genealogías provienen de variedades Peruanas, lo cual explica el hecho que estén altamente correlacionadas. Además, presentan un color de semilla muy parecido y ambos son resistentes a enfermedades radicales causadas por *Fusarium*.

Las variedades Ecuador 60 e ICA Guaitara presentaron distancias genéticas un poco mayores, con respecto a Tundama y Calima. Ecuador 60 y Guaitara no presentan similitudes morfológicas, sin embargo, las dos accesiones se siembran en el Ecuador y pertenecen al mismo centro de domesticación lo cual puede ser la razón de la cercanía genética.

La explicación de que estas cuatro variedades se encuentren reunidas en este subgrupo es que todas pertenecen a la zona Peruano-Ecuatoriana, que es la zona de hibridación de los materiales mesoamericanos y andinos o, posiblemente, a un nuevo centro de domesticación (Gepts, 1994, Driedger *et al.*, 1994).

Variedad aislada: Magdalena 10 (22), aunque se incluyó en el segundo grupo, fue la accesión que presentó una de las más grandes distancias genéticas con respecto a las demás colectas. Se ha especulado que la región nor-oriental colombiana, de donde, precisamente, proviene la variedad, es un sitio de amplia diversidad genética, por lo cual se infiere que ha podido conservar muchos genes silvestres de su localidad. Además, las características de semilla la hacen una variedad aislada. Sin embargo, el hecho que la variedad Magdalena 10 presente una relativa cercanía al subgrupo 5 y que se sugiera que la zona del Departamento del Magdalena conserve muchos genes silvestres hace pensar que, posiblemente, esta zona también sea un centro de hibridación de mesoamericanos y andinos o de domesticación incipiente.

BIBLIOGRAFIA

BASSIRI, A., y ADAMS, M.W. 1978a. An electrophoretic survey of seedling isozymes in several *Phaseolus* species. Euphytica 27: 447-459.

BASSIRI A., y ADAMS, M.W. 1978b. Evaluation of common bean cultivars relationships by mean isozyme electrophoretic patterns. Euphytica 27: 707-720.

CLAROS, J.L., DEBOUCK, D.G., ANDRADE, M. y IWANAGA, M. 1993. Studies of genetic diversity in wild *P. vulgaris* using phaseolin and isozymes. Proceedings Beans Advanced Biotechnology. Research Network. Born. Roca W.M. *et al.* (eds.) .CIAT Cali-Colombia.

DEBOUCK, C., TORO, O., PAREDES, O.M., JOHNSON, W.C. y GEPTS, P. 1993. Genetic diversity and ecological distribution of *P. vulgaris* (Fabacea) in north-western South America. *Economic Botany* 47(4): 408-423.

DRIEDGER D.R., WATTS, B.M., HUSSAIN, A. y ELIAS, L.G. 1994. Isozyme and cotyledon protein variations for identification of black beans (*P. vulgaris* L.) with similar seed morphology. *Euphytica* 74: 27-34.

GEPTS, S.P., y BLISS, F.A. 1996. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*P. vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.*, 40: 469-478.

GEPTS, S.P., OSBORN, T.C., RASHKA, K., y BLISS, F.A. 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and land races of the common bean (*P. vulgaris*) evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.*, 44 (3 suppl.): 28-38.

GEPTS, S.P. 1994. 11• Congreso Latinoamericano de Genética (área vegetal) y XV Congreso de Fitogenética, Monterrey, Nuevo León, Mexico. 27p.

HUSSAIN, A., RAMIREZ, H. y ROCA, W. M. 1986. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. CIAT. Cali. Colombia.

IUB. 1978. Enzyme nomenclature. New York. Academic Press. 606 p.

KOENIG, R. y GEPTS, P. 1989. Allozyme diversity in wild *P. vulgaris*: Further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor. Appl. Genetics.*, 78: 809-817.

LIGARRETO, G. 1996. Comunicación personal. Programa Nacional de Recursos Genéticos Vegetales, CORPOICA. Bogotá.

SINGH, S.P., NODARY, R. y GEPTS, P. 1991a. Genetic diversity in cultivated common bean. I Allozymes. *Crop Sci.* 31: 19 - 23.

SINGH, S.P., GUTIERREZ, J.A., MOLINA, A., URREA, C. y GEPTS, P. 1991b. Genetic diversity in cultivated common bean: II Marker- based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci.* 31: 23 -29.

SNEATH, P. H. y SOKAL, R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.

VARGAS, J. 1988. Caracterización de los acervos genéticos de *P. vulgaris* por medio de electroforesis de isoenzimas. Tesis de Grado. Universidad del Valle, Cali - Colombia.

WEEDEN, N.F. 1984. Distinguishing among white seeded bean cultivars by means of allozyme genotypes. *Euphytica* 33: 199-208.