

- Las isoenzimas representan sólo un pequeña porción de todo el genoma de la planta.
- La técnica de tinción de isoenzimas no detecta las siguientes especies proteicas:
 - a. Las enzimas que están por debajo de los límites de su detección.
 - b. Las proteínas estructurales.
 - c. Las enzimas que están presentes en el extracto pero no pueden detectarse porque aún se desconoce la forma de teñir sus productos.
 - d. Las enzimas que intervienen en muchas vías metabólicas, y que aún se desconocen.
- Las isoenzimas están influenciadas por la edad de la planta, ya que los genes que codifican para ellas sólo se expresan en estadios específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos.

Lo ideal, por tanto, es evaluar los materiales de una colección analizando directamente su genoma, es decir, mediante la nueva metodología que estudia el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs).

Electroforesis de isoenzimas aplicada a la yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se propaga tradicionalmente por estacas y no por semilla sexual, dado que es una especie altamente heterocigótica.

La colección de yuca del CIAT consta actualmente de unas 5000 variedades, y aumenta cada año. El banco de germoplasma de yuca se mantiene vivo en el campo y cada año es renovado. En las evaluaciones de rutina se ha observado un alto grado de duplicación morfológica en la colección; por tanto, fue necesario evaluar la colección con las técnicas de electroforesis de isoenzimas para confirmar los duplicados detectados mediante las características morfológicas y para identificar nuevos duplicados.

Esta evaluación se hizo empleando los patrones electroforéticos de la isoenzima alfa-beta-esterasa (Ramírez et al., 1987; Hussain et al., 1988; CIAT, 1988a), ya que este marcador isoenzimático ha mostrado mayor polimorfismo (variaciones en los patrones electroforéticos) en las variedades evaluadas hasta el momento. La metodología seguida para la tinción de la isoenzima alfa-beta-esterasa se esquematiza en la (Figura 36.8).

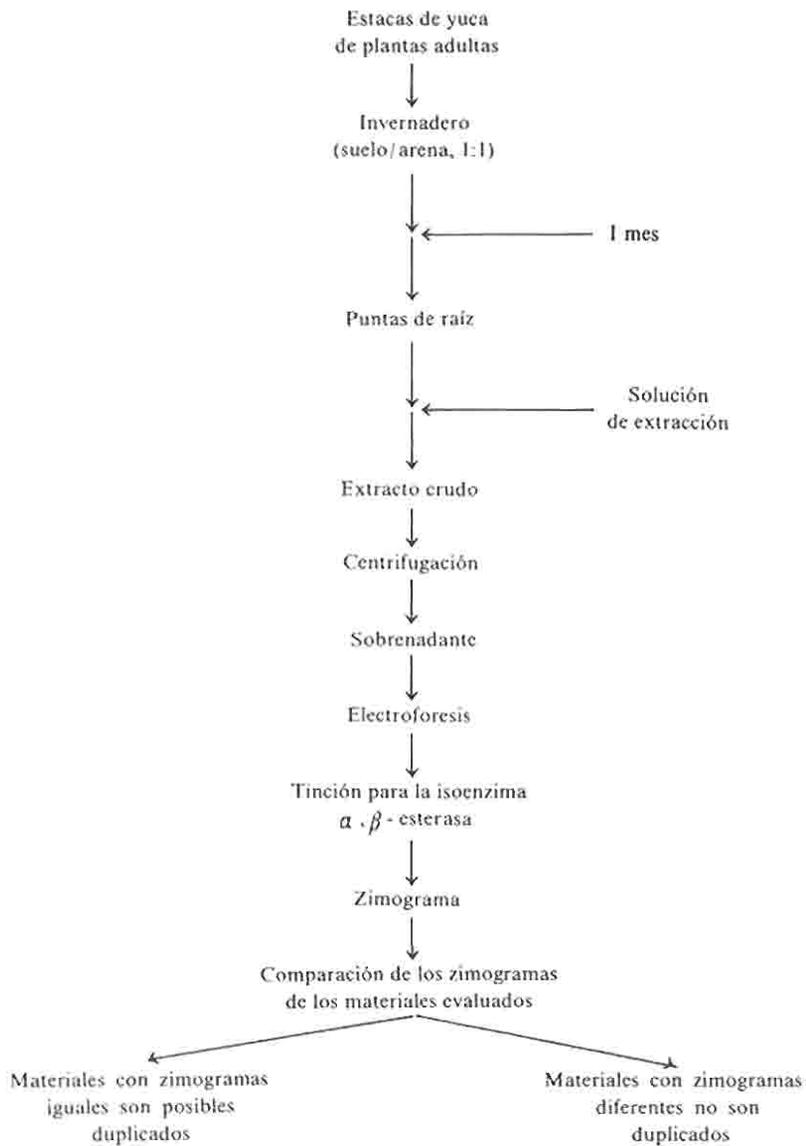


Figura 36.8. Metodología seguida para la tinción de la isoenzima α β -esterasa.

Se seleccionaron 100 clones de yuca con criterios definidos (Chávez et al., 1988) para que representen un acervo genético que cubra gran parte de la variabilidad genética de la colección de yuca mantenida en el CIAT. Por medio del análisis electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa, se identificaron 16 bandas en esos clones (señaladas con las minúsculas a-p).

También se identificaron las mismas 16 bandas en 1200 clones de yuca evaluados hasta el momento.³ El patrón electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa de un individuo puede estar constituido por 5 a 12 bandas de las 16 definidas. Las primeras bandas se identifican fácilmente usando una variedad testigo cuyo patrón de bandas, que es conocido, se corre en cada una de las electroforesis (Figura 36.9). De esta forma, dos individuos serán duplicados posibles cuando presenten las mismas características morfológicas o fisiológicas y el mismo patrón electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa. Esto no significa que la duplicidad de los dos individuos esté garantizada en un 100%, ya que ésta debe confirmarse con nuevos marcadores isoenzimáticos o con la evaluación directa de sus genomas mediante la técnica de los RFLPs; no obstante, existe una alta probabilidad de que esos materiales sean duplicados.

La determinación de la movilidad electroforética relativa (MER) de cada banda dentro de un zimograma se hace mediante la siguiente relación:

$$MER = (ME_i / ME_r) \times 100$$

Donde: MER = Movilidad electroforética relativa

ME_i = Movilidad electroforética de la banda i (en mm)

ME_r = Movilidad electroforética de la banda de referencia (en mm)

100 = Valor relativo de la banda de referencia

La banda de referencia puede ser la banda de mayor migración de la variedad tomada como testigo (Figura 36.10).

El análisis anterior permite concluir que dos individuos podrían ser duplicados cuando, además de presentar las mismas características morfológicas o fisiológicas, tienen zimogramas con el mismo número de bandas y con las mismas movilidades electroforéticas relativas.

De otra parte, la intensidad de las bandas daría una idea de la concentración y de la actividad catalítica de la enzima en el extracto crudo del tejido.

3. Hershey, C. y Ocampo, C. Comunicación personal.

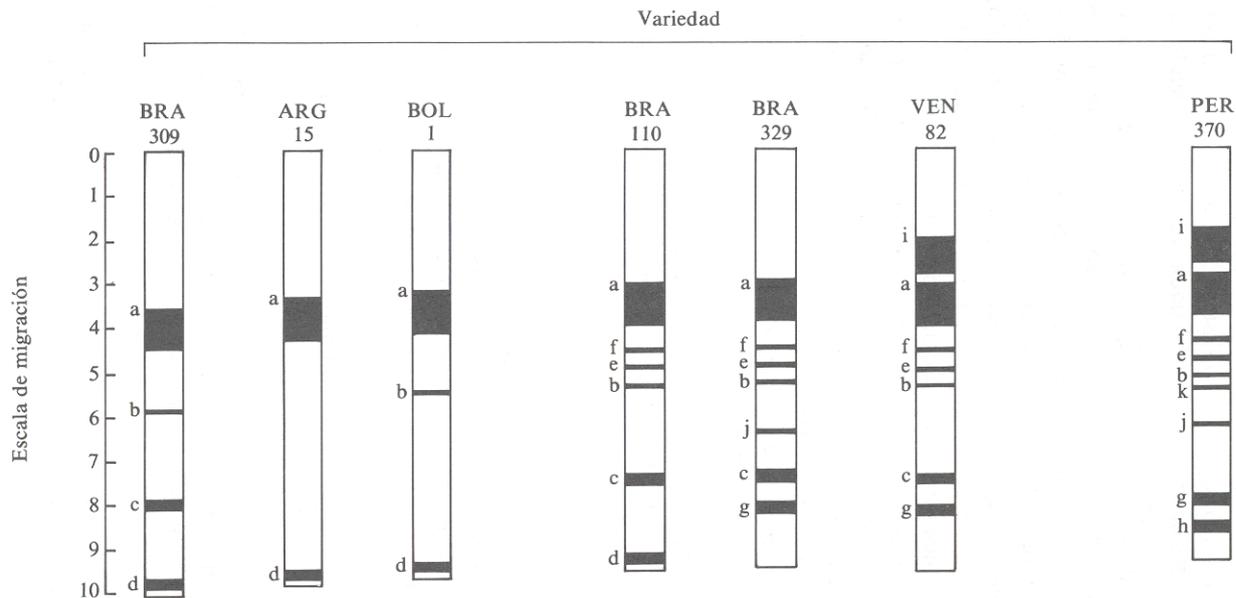


Figura 36.9 Identificación de bandas del patrón de α , β -esterasa en siete variedades de yuca.

FUENTE: CIAT, 1988a.

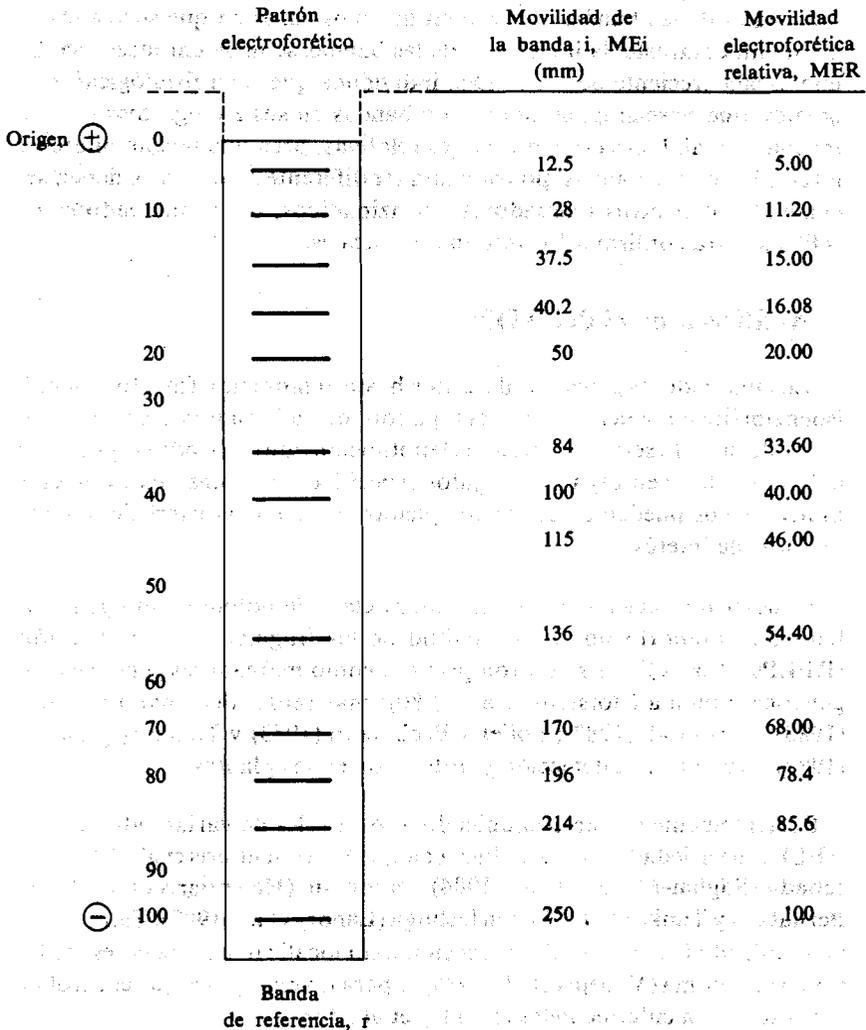


Figura 36.10. Obtención de las movilidades electroforéticas relativas en un patrón de bandas hipotético. Se tomó como banda de referencia la de mayor migración (ver texto), que recibe, por tanto, el valor 100 en una escala arbitraria de 0 a 100. La fórmula, en este ejemplo, será: $MER = (ME_i/250) \times 100$.

La intensidad de las bandas de una misma variedad puede variar de una electroforesis a otra, debido principalmente a efectos ambientales o a efectos del proceso, que consta de varios pasos. Aunque los materiales se evalúan bajo las mismas condiciones ambientales, no se tiene en cuenta la

intensidad de las bandas excepto en aquellos casos en que se vea claramente un contraste; la intensidad de las bandas se mide entonces usando una escala creciente de 1 a 5. Dos individuos que sean fisiológicamente iguales, que posean igual número de bandas en sus zimogramas con las mismas movilidades electroforéticas relativas, pero que tengan diferente intensidad en sus bandas, podrían aún ser diferentes; por tanto, deben ser evaluados con otros marcadores isoenzimáticos, o con marcadores de RFLPs, para confirmar los resultados iniciales.

Análisis a nivel del ADN

Los marcadores genéticos descritos hasta el momento (morfológicos e isoenzimáticos) tienen una desventaja: son regulados a través del desarrollo, es decir, sólo serían expresados fenotípicamente en estados específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos. Además, los caracteres morfológicos pueden tener efectos pleiotrópicos en características agromónicas de interés.

Se describió recientemente una nueva clase de polimorfismo genético llamado polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Los RFLPs se usaron primero como marcadores genéticos, en genética humana (Botstein et al., 1980); más tarde, Beckmann y Soller (1983), Burr et al. (1983), Soller y Beckmann (1983) y Tanksley y Orton (1983) estudiaron su detección y utilización en las plantas.

Recientemente se han comunicado altos niveles de variabilidad en los RFLPs en variedades de maíz (Burr et al., 1983; Helentjaris et al., 1986), en cebada (Saghai-Moroof et al., 1984), en tomate (Helentjaris et al., 1986; Bernatzky y Tanksley, 1986) y en lechuga (Landry et al., 1987). También se han utilizado fragmentos de restricción para localizar secuencias específicas en el genoma (Vallejos et al., 1985), y para mapear genes que controlan la resistencia a enfermedades (Landry et al., 1987).

Esta metodología ha sido empleada también para caracterizar genomas simples, como el de la mitocondria y el del cloroplasto. Flavell et al. (1983) encontraron diferencias entre accesiones de maíz de México analizando fragmentos de restricción del ADN de las mitocondrias del maíz. En contraste, los niveles de diversidad del ADN del cloroplasto son mucho menores que los del ADN de la mitocondria. Clegg et al. (1984) analizaron el ADN de cloroplastos de líneas cultivadas y silvestres de cebada, y encontraron mucho menos diversidad entre las líneas cultivadas que entre las silvestres.

La metodología para producir los RFLPs se basa en el uso de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas del ADN y lo cortan en los sitios en que éstas se hallan o en sitios adyacentes. Cuanto más frecuente sea ese sitio de reconocimiento para la enzima, el ADN será cortado con más frecuencia (Figura 36.11). Los fragmentos de ADN producidos de esta manera pueden separarse por medio de la electroforesis, y los fragmentos más pequeños se moverán mas rápidamente en el gel. Cuando el ADN de un organismo superior es digerido por una enzima de restricción, se producen muchos fragmentos de diferentes longitudes que, al separarse a lo largo del gel, formarán una mancha continua, visible cuando el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio y es observado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Un fragmento específico sólo puede detectarse con una sonda apropiada, es decir, con un fragmento de ADN que ya ha sido clonado y que sea

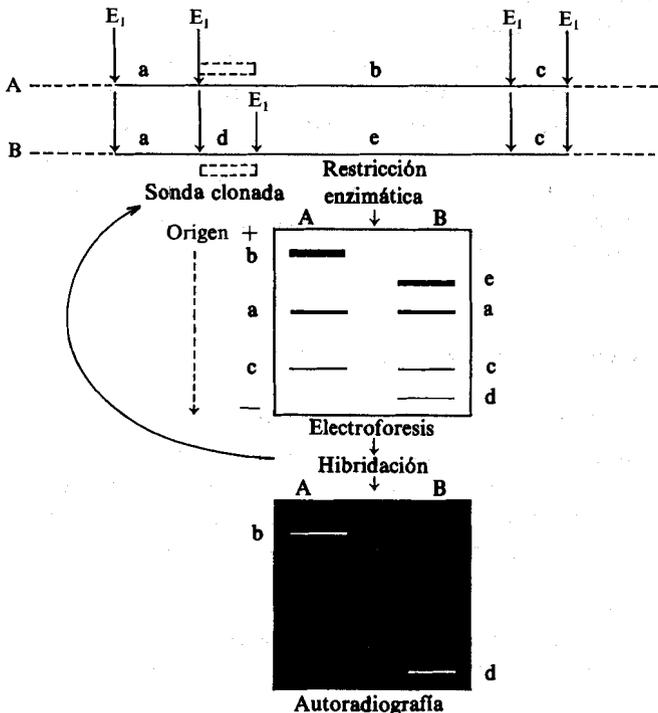


Figura 36.11. Ejemplo hipotético que ilustra el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción. E_1 = enzima de restricción específica. A, B = fragmentos largos de ADN cromosómico en estudio.

FUENTE: Bernatzky, 1988.

homólogo de aquél que se desea visualizar. Los diferentes fragmentos presentes en el gel se deben transferir a un soporte sólido, donde serán expuestos a una sonda marcada radioactivamente en condiciones que favorezcan la hibridación ADN-ADN. El soporte se usa entonces para exponer una película fotográfica la cual, después de ser revelada, hará visible el fragmento de ADN que se hibridó con la sonda (Figura 36.12). Utilizando este tipo de sonda de ADN único, puede detectarse un fragmento de rara ocurrencia (uno en un millón o menos frecuente). Las sondas de ADN utilizadas para los RFLPs no necesitan ser homólogas de genes conocidos. Cualquier secuencia de ADN puede servir para los RFLPs, siempre y cuando pueda hibridarse con algunos de los fragmentos producidos después del proceso de restricción.

Cualquier cambio ocasionado por mutaciones puntuales en el ADN puede alterar la secuencia de reconocimiento típica de una enzima de restricción, en particular eliminando o creando nuevos sitios de reconocimiento. De manera similar, supresiones o trasposiciones de grandes fragmentos de ADN pueden originar cambios simultáneos en los patrones de restricción de diferentes enzimas. En consecuencia, una enzima de restricción determinada no cortará el ADN de dos individuos por el mismo lugar. Por tanto, se formarán fragmentos de diferente longitud cuando el ADN de los dos individuos sea cortado por la misma enzima. A causa de su diferencia en longitud, esos fragmentos se localizarán en posiciones diferentes una vez concluidas la electroforesis, la hibridación y la autoradiografía (Figuras 36.11 y 36.12).

Aplicaciones y ventajas de los RFLPs

Entre las aplicaciones de los RFLPs se encuentran: a) la caracterización de variedades; b) la identificación de los loci genéticos que afectan las características multigénicas o cuantitativas; y c) el desarrollo de programas de mejoramiento genético mediante evaluación de germoplasma, introgresión, mejoramiento de híbridos comerciales, y selección dentro de las poblaciones.

Los RFLPs ofrecen muchas más ventajas que las isoenzimas y que los métodos de evaluación tradicionales, por las siguientes razones:

- Los RFLPs no están afectados por el medio ambiente.
- Los patrones de RFLPs pueden determinarse en el DNA extraído en cualquier época de la vida del organismo.

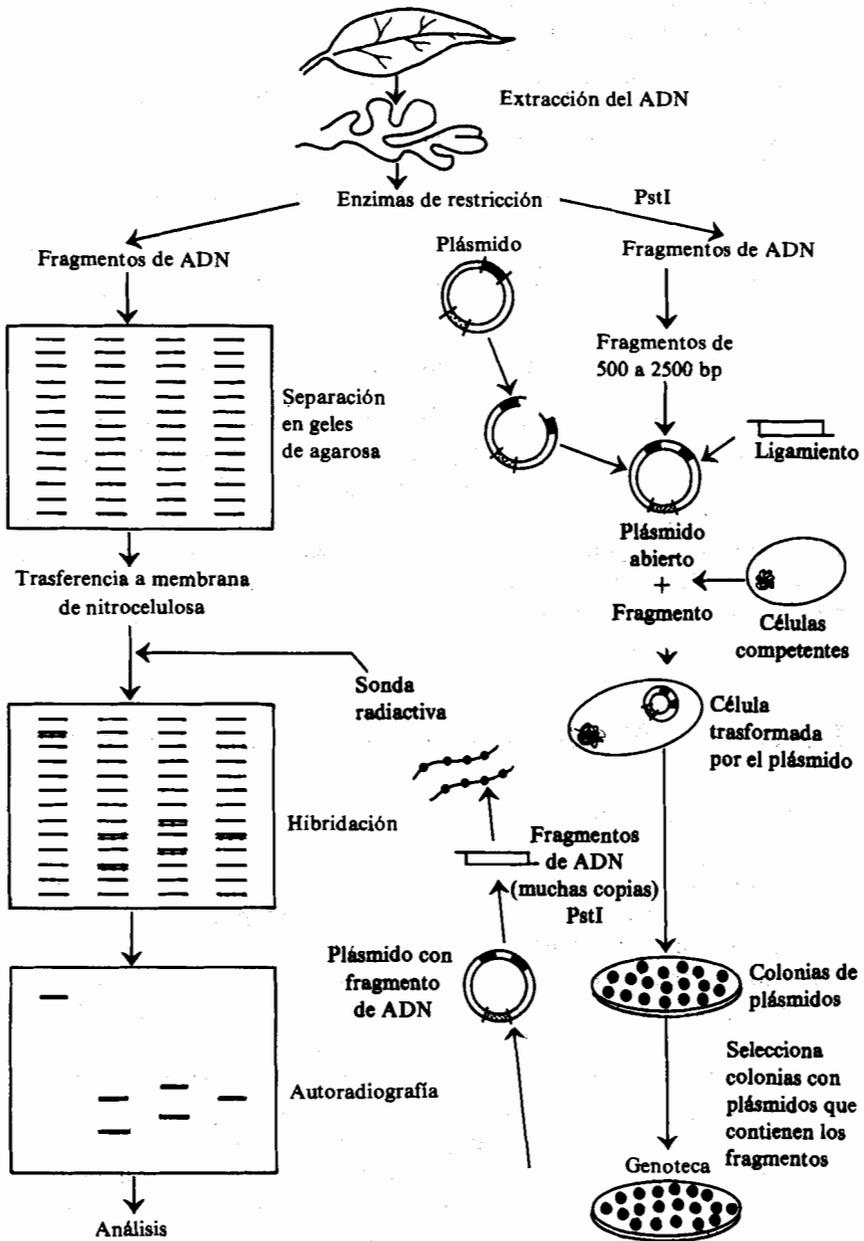


Figura 36.12. Secuencia del proceso de detección de los RFLPs. PstI = endonucleasa de restricción derivada de *Pseudomonas* sp. bp = pares de bases.

- El número de marcadores de RFLPs que se pueden estudiar en una simple progenie es bastante grande.
- Con los RFLPs se puede analizar todo el genoma.
- Los RFLPs expresan codominancia.
- Los RFLPs del genoma nuclear siguen una herencia mendeliana simple.
- Los RFLPs de genomas de organelos (mitocondria, cloroplasto) siguen una herencia materna.
- Los RFLPs no tienen efectos pleiotrópicos.

Esta y otras técnicas moleculares han sido de gran valor, no sólo para caracterizar y evaluar materiales, sino también en trabajos de ingeniería genética. En efecto, algunos marcadores (genes específicos), adecuadamente manipulados pueden transferirse a las plantas mediante técnicas de cultivo de tejidos y transformación. En consecuencia, la obtención de nuevas variedades aprovechando bien estas nuevas tecnologías, exige una buena coordinación entre los programas de mejoramiento tradicional y los programas de biotecnología.

La Biología Molecular en el Mejoramiento Genético

Mapas genéticos

Se entiende por 'mapeo' genético la ubicación espacial de un gen en una región específica de un cromosoma. Es necesario 'mapear' los marcadores moleculares como los RFLPs, una vez hayan sido identificados. Esta operación es simple cuando se posee material genético especial. Por ejemplo, en maíz se desarrolló un mapa con 130 loci (RFLPs) que cubría los 10 cromosomas del maíz y, en ellos, el 50% del mapa genético de esta especie, utilizando líneas monosómicas y análisis de segregantes (Helentjaris et al., 1986). También se pueden hacer mapas genéticos utilizando series de aneuploides, como se hizo en el trigo (García-Olmedo et al., 1982). Otras técnicas de mapeo son las líneas celulares de híbridos somáticos interespecíficos (D'Eustachio y Ruddle, 1983), la hibridación in situ (Harper y Saunders, 1981), y las genotecas de cromosomas particulares (Cavanee et al., 1984). Las técnicas antes mencionadas son obviamente de gran utilidad en los cultivos que disponen de facilidades para estas operaciones genéticas. Sin embargo, cuando no existe ningún material especial —como el

antes mencionado— para hacer el mapa genético, éste se puede construir por análisis de segregantes.

Análisis de características multigénicas

Aunque muchas de las características de las especies cultivables—incluyendo la resistencia a las enfermedades— están determinadas por loci que tienen un efecto drástico en el fenotipo, la mayoría de las características de importancia económica, como el rendimiento y la resistencia horizontal al estrés, son de naturaleza cuantitativa. Así pues, habrá variación fenotípica en las características continuas entre un individuo y otro, y una distribución normal de los valores fenotípicos en una población particular. Las diferencias genéticas que afectan las características cuantitativas, ya sea dentro de las poblaciones o entre ellas, están determinadas por un número relativamente grande de loci, cada uno de los cuales aporta una pequeña contribución cuantitativa, sea ésta positiva o negativa, hasta que se obtiene el valor fenotípico final de una característica. Esta clase de loci se denomina 'loci para característica cuantitativa' (Geldermann, 1975), cuyas siglas son QTL (del inglés, quantitative trait loci).

Utilizando diseños experimentales especiales y ciertos análisis de datos, llamados colectivamente genética cuantitativa o biométrica (Falconer, 1981), ha sido posible comprender un poco la arquitectura genética de las características cuantitativas, y utilizar este conocimiento como guía para los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, la dificultad para distinguir y manejar, en los programas de mejoramiento, loci individuales que afectan una característica de importancia económica impone una gran limitación a la efectividad de la genética clásica en los procedimientos de mejoramiento. De igual manera, la identificación de los genes que afectan una característica cuantitativa limita su clonamiento y su aplicación en ingeniería genética. En conclusión, los dos métodos disponibles para el mejoramiento genético están más o menos limitados en su capacidad para manejar las características cuantitativas.

Se demostró recientemente que los RFLPs proporcionan un método confiable para transformar los QTL en entidades mendelianas o cuasimendelianas; unas y otras serían fácilmente manipuladas en los programas de mejoramiento genético y en un futuro podrían usarse para clonamiento en proyectos de ingeniería genética. Utilizando los RFLPs, existen básicamente dos vías para identificar y manipular los QTL: a) determinación del ligamiento entre RFLP y QTL para hacer luego el mapa de evaluación de los efectos de los QTL, y b) identificación y clonamiento de los QTL empleando métodos de mutagénesis por inserción.

Paterson et al. (1988) describieron un nuevo método para el análisis de QTL. Se utilizó un mapa genético detallado que, partiendo de los RFLPs, evidenciaba los factores genéticos que afectaban varias características de la fruta del tomate (peso de la fruta, concentración de sólidos solubles, y pH). Este método emplea un mapeo a intervalos que utiliza el método estadístico de máxima probabilidad. El mapeo a intervalos da cuenta de los efectos de cada segmento genómico localizado entre dos loci marcadores, y no de los efectos asociados con loci individuales. Esto reduce las confusiones que se pueden presentar por los efectos de recombinación entre los loci marcadores y los QTL.

Conclusiones

La biología molecular se está convirtiendo en una herramienta poderosa en los programas de mejoramiento. Se están acumulando metodologías para determinar la presencia de marcadores que serán fácilmente detectados y rastreados en los programas de mejoramiento. Estas nuevas tecnologías son complementarias de los métodos tradicionales. En el futuro, serán los programas coordinados que comprendan métodos tradicionales y biotecnología los que producirán las nuevas variedades mejoradas.

Referencias

- Beckmann, J. S. y Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67:35-43.
- Bernatzky, R. 1988. Restriction fragment length polymorphism. En: *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Bélgica. Cap. 2, p. 1-18.
- y Tanksley, S. D. 1986. Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* 203:8-14.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. y Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Burr, B.; Evola, S. V.; Burr, F. y Beckmann, J. S. 1983. The application of restriction fragment length polymorphisms to plant breeding. En: Setlow, J. y Hollaender, A. (eds.). *Genetic Engineering*. Plenum Press, Nueva York. p. 45-59.
- Cavannee, W.; Leach, R.; Mohandas T.; Pearson, P. L. y White R. 1984. Isolation and regional localization of DNA segments revealing polymorphic loci from human chromosome 13. *Am. J. Hum. Genet.* 36:10-24.

- Chávez, R.; Roca, W. M.; Arias, D. I.; Withers, L. y Williams, J. T. 1988. Cooperative project IBPGR-CIAT to establish a pilot *in vitro* genebank. Diversity 16.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988a. Biotechnology Research Unit annual report. Cali, Colombia. 102 p.
- . 1988b. Bean Program annual report 1987. Cali, Colombia. p. 131-143.
- Clegg, M. T.; Brown, A. H. D. y Whitfield, P. R. 1984. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: Implications for genetic conservation. Genet. Res. 43:339-343.
- D'Eustachio, P. y Ruddle, P. H. 1983. Somatic cell genetics and gene families. Science 220:919-924.
- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. 2nd. edition. The Ronald Press Co., Nueva York.
- Flavell, R. B.; Kemble, R. J.; Gunn, R. E.; Abbott, A. y Baulcombe, D. 1983. Applications of molecular biology in plant breeding: The detection of genetic variation and viral pathogens. En: Better crops for food. Ciba Foundation Symposium 97. Pitman, Londres. p. 198-212.
- García-Olmedo, F.; Carbonero, P. y Jones B. L. 1982. Chromosomal location of genes that control wheat endosperm proteins. Adv. Cercol. Sci. Technol. 5:1-47.
- Geldermann, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers; 1: Methods. Theor. Appl. Genet. 46:319-330.
- Gepts, P. y Bliss, F. A. 1985. Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Econ. Bot. 40:469-478.
- ; Osborn, T. C.; Rashka, K. y Bliss, F. A. 1986. 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.
- . 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. En: Gepts, P. (ed.). Genetic resources, domestication and evolution of *Phaseolus* bean. Klumer, Dordrecht, Holanda. p. 215-241.
- Harper, M. E. y Saunders G. F. 1981. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by using *in situ* hybridization. Chromosoma 83:431-439.
- Helentjaris T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schaefer, A. y Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72:761-769.

- Hussain, A.; Bushuk, W.; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1987. Polyacrylamide gel electroforesis procedures for cultivar identification of field bean, cassava and pasture legumes: Working document no. 22. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 10 p.
- ; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1986. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. Documento de trabajo no. 19 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 60 p.
- ; ———; Bushuk, W. y Roca, W. M. 1986. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar identification by electroforegrams of cotyledon storage proteins. *Euphytica* 35:729-732.
- ; ———; ——— y ———. 1988. Interaccession variation of electroforegrams of cotyledon protein of field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 39:109-111.
- Landry, B. S.; Kesseli, R. V.; Farrara, B. y Michelmores, R. W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Maniatis, T; Fritsh, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Maquet, A.; Posso, C. E. y Debouck, D. G. 1988. Biochemical evidence for two different gene pools in lima beans. Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.
- Market, C. L. y Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. (E.U.)* 45:753-763.
- Muñoz, F. L. C. 1985. Problemas en la hibridación interespecífica en el género *Phaseolus*: Ensayo preliminar con cultivo de embriones. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, Palmira, Colombia. 95 p.
- Osborn, T. C.; Alexander, D. C.; Sun, S. S.; Cardona, C. y Bliss, F. A. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science* 240:207-210.
- Paterson A.; Lander, E. S.; Hewitt, J. D; Paterson, S.; Lincoln S. E. y Tanksley, S. D. 1988. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map polymorphisms. *Nature* 335:721-726.
- Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W. M. y Bushuk, W. 1987. Isozyme electroforegrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *Euphytica* 36:39-48.

- Reynolds, M.; Weinhold, A. R. y Morris, T. J. 1983. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathol. Z.* 20:165-226.
- Rider, C. C. y Taylor, C. B. 1980. *Isoenzymes*. 1980. Chapman and Hall, Nueva York. p. 8.
- Saghai-Moroof, M. A.; Soliman, K. M.; Jorgensen, R. A. y Allard R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. (E.U.)* 81:8014-8018.
- Soller, M. y Beckman, J. S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* 67:25-53.
- Sprecher, S. L. 1988. New isozyme variants at two NADH diaphorase loci in dry bean: Correlations in gene pools and commercial classes. *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 31:92.
- Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.) 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Partes A y B. Elsevier Sci. Publ., Nueva York.
- Thome, J.; Vargas, J.; Roca, W. M. y Debouck, D. G. 1988. Are the Southern Andes a broader area of domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.
- Triana, M. E.; Debouck, D. G.; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1988. Electrophoretic study of phaseolin in African germplasm collections of common bean. Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.
- . 1988. Estudio electroforético de germoplasma de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en centros secundarios de diversidad genética: El caso de Africa Suroriental. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, Palmira, Colombia.
- Vallejos, C. E.; Tanksley, S. D. y Bernatzky, R. 1985. Localization in the tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45s), the major chlorophyll a/b binding polypeptide, and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics* 112:93-105.
- Vargas, J. 1988. Caracterización de los acervos genéticos de *Phaseolus vulgaris* L. por medio de la electroforesis. Tesis. Facultad de Biología, Universidad del Valle, Cali. 73 p.
- Watson, J. D.; Toose, J. y Kurtz, D. T. 1983. *Recombinant DNA: A short course*. Scientific American Books, Freeman, Nueva York.