

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA Y
EXPERIMENTAL 2519 (Fríjol * Maíz)
(*Phaseolus vulgaris L.* * *Zea mays L.*)**

GERARDO A. MORENO DURAN , I.A.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
POSGRADO EN BIOLOGÍA**

Santafé de Bogotá, D.C. Diciembre del año 2000

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA Y
EXPERIMENTAL 2519 (Fríjol * Maíz)
(*Phaseolus vulgaris L.* Zea mays L.*)**

GERARDO A. MORENO DURAN , I.A.

**CARLOS CORREDOR P., Ph. D.
DIRECTOR**

**LEONARDO LAREO , M. Sc.
CODIRECTOR**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
POSGRADO EN BIOLOGÍA**

Santafé de Bogotá, D.C. Diciembre del año 2000

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA Y
EXPERIMENTAL 2519 (Fríjol * Maíz)
(*Phaseolus vulgaris L.* * *Zea mays L.*)**

GERARDO A. MORENO DURAN , I.A.

CARLOS CORREDOR P. Ph. D.
Decano Académico
Facultad de Ciencias

LUIS A. BARRERA , Ph. D.
Director de Postgrado
Facultad de Ciencias

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
POSGRADO EN BIOLOGÍA**

Santafé de Bogotá, D.C. Diciembre del año 2000

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA Y
EXPERIMENTAL 2519 (Fríjol * Maíz)
(*Phaseolus vulgaris L.* * *Zea mays L.*)**

GERARDO A. MORENO DURAN , I.A.

GERARDO LOPEZ J., Ph D
JURADO

GUSTAVO LIGARRETO, M Sc.
JURADO

BERTHA DE DULCE, Ph D
JURADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
POSGRADO EN BIOLOGÍA**

Santafé de Bogotá, D.C. Diciembre del año 2000

Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas son de exclusiva responsabilidad del autor y no comprometen en nada a la PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

**Artículo 23 de la Resolución del 13 de Julio de 1946.
Estatutos de la Pontificia Universidad Javeriana**

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA
Y EXPERIMENTAL 2519 (*Fríjol * Maíz*)
(*Phaseolus vulgaris L. * Zea mays L.*)**

GERARDO A. MORENO DURAN , I.A.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA**

Santafé de Bogotá, D. C., Diciembre de 2000

CONTENIDO

RESUMEN	Página
SUMMARY	
• LISTA DE TABLAS	
• LISTA DE GRAFICOS	
• LISTA DE ANEXOS	
INTRODUCCION	7
JUSTIFICACION	10
MARCO TEORICO	12
• MAIZ	12
• FRIJOL	13
• MEJORAMIENTO DE FRIJOL	15
• BIOTECNOLOGIA	20
• INGENIERIA GENETICA	20
• INJERTOS	22
• HETEROINJERTO BERNAL	26
• PROTEINAS	27
• CUANTIFICACION DE PROTEINAS	28
• ELECTROFORESIS	29
• DIGESTIBILIDAD DE PROTEINAS	35
MATERIALES Y METODOS	38
• SELECCION DE MUESTRAS DE FRIJOL	38
• SELECCION DE SEMILLAS	40
• OBTENCION DE LAS HARINAS	40

• EXTRACCION DE LAS PROTEÍNAS	41
• CUANTIFICACION DE LAS PROTEÍNAS	42
• ESTANDARIZACION PROTOCOLOS	42
• ELECTROFORESIS	43
• DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i> .	48
ANALISIS DE RESULTADOS	50
• CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS	50
• ELECTROFORESIS	51
• DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i>	57
DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS	60
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFIA	76
ANEXOS	81

SUMMARY

In 1994, in the Science Faculty of Pontificia Universidad Javeriana, were carried out 172 grafts, among different varieties of bean ICA CERINZA *Phaseolus vulgaris* L, and OPAQUE corn ICA V 557 *Zea mays*, L. It was obtained a bean experimentally named **2519**, which yielded abundant and fertile seeds that reproduced properly. In 1995, in the Colombian Corporation of Agricultural investigations, CORPOICA, it was compared these beans experimentally, and got in the second semester of 1996, enough seeds from generations F2 to F5.

In the present work, we proposed to find out, the seeds characteristics of protein and to investigate the digestibility of these proteins. The Percentage of protein of these seeds, was 8.56% for OPAQUE corn; 17.9% for bean ICA CERINZA, and 22.05% as the average of the five offsprings. The differences are highly significant. The protein increment for the offsprings was about 23% above that one of the bean ICA CERINZA. The electrophoretic profiles in SDS-PAGE 12% gels showed different percentages of distribution of the bands of proteins, grouped in relative mobilities.

We also tested "in vitro" the digestibility of the proteins from the beans, using Trypsin, Pepsin, and mixture of both enzymes (1.6 mg/ml and 1.3 mg/ml respectively), and we did not get significant differences.

The results show that the methodology of the Bernal grafts, for the present model of study, yielded fertile seeds, even in 5 offsprings, and high percentages of proteins. These proteins show variations in the electrophoretic profiles obtained with SDS-PAGE, and values of digestibility similar to the maternal parental. Finally, the results show that this methodology is very promissory to obtain improved plant cultivations.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L, *Zea mays*, L, SQB, Heterograft, SDS-PAGE, Improvement of plants, Proteins, Digestibility *in vitro*, Trypsin, Pepsin.

RESUMEN

En 1994, en la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, se realizaron 172 heteroinjertos, entre las variedades de frijol ICA CERINZA *Phaseolus vulgaris* L, y maíz OPACO ICA V 557 *Zea mays*, L. Se obtuvo un frijol denominado experimentalmente **2519**, el cual produjo abundantes semillas fértiles, las cuales se propagaron y compararon en ensayos experimentales en 1995, en la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias, CORPOICA, hasta obtener en el segundo semestre de 1996, semillas suficientes de las generaciones F2 a F5.

Analizadas las semillas, se obtuvo un porcentaje de proteína de 8.56% para Maíz Opaco, de 17.9% para frijol ICA CERINZA y de 22.05% para el promedio de las cinco progenies. Las diferencias son altamente significativas. El incremento de proteína en las progenies fue un 23% sobre el valor del frijol ICA CERINZA.

En las Electroforesis nativas, con protocolos de extracción de proteínas tipo CIAT para frijol y de Landry y Moureaux, para maíz, sobre geles de poliacrilamida del 12 %, se pudo apreciar que las proteínas de Frijol y maíz son diferentes, y que hay alta similitud entre las proteínas del frijol ICA CERINZA y las progenies del frijol experimental 2519.

Sin embargo los perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE del 12%, mostraron que el porcentaje de distribución de las bandas de proteína agrupados en rangos de movilidades relativas entre 0.1 y 0.49 fueron para el maíz Opaco un 8.2%, para el frijol ICA CERINZA 38.7% y para el promedio de las progenies experimentales 44.4%. Para las movilidades relativas con rangos entre 0.5 y 0.99, los porcentajes fueron del 92.8% para maíz Opaco; de 61.4% para Frijol ICA CERINZA y del 54% para el promedio de las progenies 2519.

Se determinó la digestibilidad "*In vitro*" de las proteínas de estos frijoles utilizando las enzimas digestivas Tripsina, Pepsina y la mezcla de las dos (1.6 mg/ml y 1.3 mg/ml respectivamente) y se encontró que no hay

diferencias significativas.

Los resultados demuestran que en este modelo de planta a investigar, la utilización de la metodología del Heteroinjerto Bernal produjo semillas fértiles, progenies F1 a F5, con alto porcentaje de proteína, que muestran variaciones en los perfiles electroforéticos obtenidos con SDS-PAGE y que la digestibilidad es similar al parental materno. Los resultados son muy promisorios y el uso de esta metodología permite obtener cultivares mejorados de plantas.

- Palabras claves: ***Phaseolus vulgaris* L**, ***Zea mays***, L, SQB, Heteroinjerto, SDS-PAGE, Mejoramiento de plantas, Proteínas, Digestibilidad ***in vitro***, Tripsina, Pepsina.

INTRODUCCION

El fríjol *Phaseolus vulgaris*, L. es una fuente económica de proteínas que puede contribuir a la solución de los problemas alimenticios en América Latina. Los granos de las leguminosas son una importante fuente de proteínas (17 al 35%) para la dieta humana tanto en América como en Africa.

Las leguminosas, los cereales y los tubérculos son componentes importantes en las dietas tropicales. En general cuando una comunidad tiene acceso a productos de leguminosas y cereales de buena calidad en cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades de energía suele estar muy cerca de satisfacer también las de las proteínas.

Según **FAO, 1990**, la proteína de las leguminosas constituye el suplemento natural de las proteínas de los cereales, ya que las primeras son ricas en Lisina y las segundas ricas en Metionina. Si se consumen juntos cereales y leguminosas en la misma comida, el porcentaje de proteína utilizable puede elevarse considerablemente.

Aunque las proteínas de los frijoles son ricas en algunos aminoácidos esenciales tales como Lisina, Treonina, Isoleucina, Valina y Leucina, estas tienen relativamente un bajo valor nutritivo debido a las limitadas cantidades de Metionina y Cisteina.

En Colombia se ha trabajado en mejoramiento de fríjol, utilizando la metodología de la polinización artificial desde 1929, primero en la Estación Tulio Ospina, (1438 msnm), luego en La Selva (2200 msnm); en 1951 en el Centro Experimental Palmira (1000 msnm) y desde 1954 en el Centro Experimental Tibaitatá (2600 msnm) y en la Estación de Obonuco (2700 msnm).

En general, hasta 1932 se desarrollaron principalmente materiales nacionales y muy pocas líneas extranjeras. Luego se trabajaron líneas provenientes de las colecciones de Méjico, E.U., y Venezuela. Sobresalieron en los diferentes estudios de producción y calidad culinaria, las líneas nacionales “Algarrobo 102” y “Uribe Redondo 41”.

En 1951, en Palmira, se hicieron las primeras hibridaciones entre materiales locales y extranjeros. A partir de 1963 las variedades obtenidas por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, llevan esa sigla como distintivo.

A partir del año 1966 se encuentran publicaciones, en revistas agropecuarias de circulación nacional, **BERNAL, 1966, 1968**, en las cuales informa sobre el descubrimiento de una nueva metodología de trabajo con los vegetales, que le permitía cruzar dos plantas de diferente clasificación taxonómica, para obtener una variedad mejorada. En otros artículos **BERNAL, 1975**, aclara que: “.. la nueva variedad de planta era semejante a la variedad parental materna pero presenta diferencias en sus características agronómicas, morfológicas y nutricionales, que merecían un mayor estudio para evaluar con criterio científico los resultados obtenidos”.

BERNAL, 1981, denomina a esta metodología **Sistema Químico Biológico, (SQB)**, en 1975 y afirma haber obtenido mediante su utilización, desde 1961 hasta 1981, cerca de 200 ejemplares de plantas diferentes a las que denomina **nuevas variedades**, las cuales multiplicó y propagó ampliamente. Estas plantas obtenidas con el SQB abarcaron gran número de los Ordenes y Familias de la Clasificación Taxonómica Vegetal, **BERNAL y MORENO, 1978**. A algunas plantas se les realizó un estudio un poco más detallado, **UNIVERSIDAD DISTRITAL, 1972**, y a otros un estudio parcial en lo referente a análisis bromatológicos y comportamiento agronómico, **MORENO, 1981**.

Revisando las publicaciones internacionales sobre cruzamientos intergenéricos **McCOMB, 1975**, encontró que muchos fitomejoradores han intentado por años realizar cruces interespecíficos en leguminosas, para incrementar la diversidad en el pool de genes con los cuales se obtengan variaciones que puedan ser útiles. Cita en su escrito la revisión realizada por **KNOBLOCH, 1972**, el cual listó 8 publicaciones que citan cruces intergenéricos que, según él, son posibles en la familia de las leguminosas. Los géneros listados son todos de la familia **Papilionaceae** y los cruces principalmente entre miembros de la Tribu **Phaseoleae**. Todas las especies de plantas mencionadas son cultivadas y de interés económico.

Más adelante, **SMARTT, 1979**, revisando lo citado por **KNOBLOCH** y el artículo de **McCOMB, 1975**, citado anteriormente, afirmó que estos cruces interespecíficos no son ciertos, debido principalmente a dos razones: Primero : Las formas silvestres y cultivadas de una misma especie han recibido diferente Clasificación taxonómica y los cruzamientos entre ellas se consideraron híbridos interespecíficos. La segunda, surge de la

interpretación errónea de los resultados de hibridación interespecífica ensayados cuando se producen progenies que se asemejan fuertemente al progenitor materno. Se indica que estas progenies pueden haber sido producidas por fallas en la emasculación (eliminación de las anteras), o una apomixis accidental (producción de semilla sin polinización).

Analizando lo publicado por **BERNAL** y lo citado en la literatura, la Pontificia Universidad Javeriana decidió establecer en 1994, un **Programa de Investigación** sobre las *Características que presentan las plantas obtenidas con la Metodología del Sistema Químico Biológico*, SQB, **MORENO, 1993**, y que se propone llamar **HETEROINJERTO BERNAL, (HIB)**, con objetivos muy definidos, buscando ante todo llenar el vacío que presentan las pocas investigaciones realizadas alrededor de las características que presentan las plantas obtenidas con esta metodología.

Para dar comienzo al Programa **MORENO, 1993**, se diseñó un experimento con el fin de realizar un Heteroinjerto Bernal entre una planta de la Clase **Dicotiledónea**, Familia Leguminosas (***Phaseolus vulgaris* L. cultivar Fríjol ICA CERINZA**) con una planta de la Clase **Monocotiledónea**, Familia Graminae (***Zea mays* L. cultivar Maíz OPACO ICA V 557**).

Se realizaron 172 heteroinjertos de plantas de Fríjol con maíz, y a las plantas de fríjol obtenidas se les denominó experimentalmente **Fríjol 2519, MORENO, 1981**. En este trabajo se utilizaron plantas de diferente clasificación taxonómica con el objeto de que se pueda estudiar y demostrar sin lugar a dudas, los aspectos más sobresalientes de la metodología de **BERNAL** y a la vez establecer las características que presentan las plantas obtenidas con el uso de esta metodología.

JUSTIFICACION

Una necesidad prioritaria para la población colombiana, es la obtención de alimentos de origen vegetal de bajo costo y con alta calidad nutricional y en el cual el paquete tecnológico que conlleve su cultivo no contamine el medio ambiente. Desafortunadamente, los actuales procedimientos técnicos usados para lograr este objetivo son bastante largos y dispendiosos y otros son complicados y sumamente costosos por la tecnología que conllevan; por lo tanto es deseable poder contar con una metodología de mejoramiento genético de plantas que sea fácil de ejecutar, que muestre rápidos resultados y que produzca similares o mejores respuestas que las obtenidas actualmente con los métodos tradicionales.

Las publicaciones existentes acerca de las características que presentan las plantas obtenidas por el uso del denominado SISTEMA QUIMICO BIOLOGICO (SQB), según su descubridor (BERNAL, 1961), permiten suponer que el empleo de este procedimiento para el mejoramiento genético de plantas podría llenar las aspiraciones de fitomejoradores y cultivadores de plantas.

La PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, actual propietaria de esta metodología, decidió adelantar investigaciones sobre las características nutricionales, bioquímicas y morfoagronómicas de las plantas obtenidas con el uso de esta metodología.

Para el estudio de las características de las plantas logradas con el uso de esta metodología se planeó obtener una planta para ser analizada como modelo, que de ser posible presentara el máximo de características o de incorporación de fuentes de variación, en la cual se pudiera observar su expresión. Se utilizó como parental materno el frijol ICA CERINZA, ***Phaseolus vulgaris L.*** que posee alto porcentaje de proteína, bajo rendimiento y adaptación al medio ambiente, susceptibilidad a plagas y enfermedades, ciclo de vida corto y excelente aceptación en el mercado; como parental paterno se utilizó el maíz OPACO ICA V 557 ***Zea mays L.*** con bajo porcentaje de proteína, altos rendimientos, amplia aceptación en el mercado, adaptación al medio ambiente y un largo ciclo de vida.

Los análisis realizados en este estudio, de las diferentes progenies del frijol experimental **2519** frente a sus parentales, se centraron en las características bioquímicas de las proteínas, las cuales representan la expresión activa del material genético presente en las semillas obtenidas por una posible interacción del material genético de los dos parentales.

El hecho de determinar y analizar la concentración de las proteínas, perfil electroforético y digestibilidad, permite tener un acercamiento a las características nutricionales del frijol 2519; también nos da indicios sobre la relativa estabilidad genética al comparar los resultados obtenidos en las progenies y en los parentales utilizados. De la misma manera se pueden sugerir las tendencias que presentan los materiales experimentales y de acuerdo al número de muestras analizadas se puede extrapolar el resultado a las poblaciones estudiadas.

MARCO TEORICO

MAIZ, *Zea mays* L.

Es una planta Monocotiledónea con $2n = 20$ cromosomas. El maíz es una especie alógama, es decir de polinización cruzada. En el ápice de la planta se encuentra la panícula que produce los granos de polen, los cuales son transportados principalmente por el viento, hacia los estigmas o cabellos, expuestos más abajo en las brácteas de las hojas intermedias de la planta, y que dan origen luego de la fecundación a la mazorca. Esta condición hace que cada semilla producida sea el resultado en la mayoría de los casos de un cruzamiento de dos plantas. Las plantas de maíz son altamente heterocigotas y heterogéneas.

Aunque los cereales proporcionan más del 70 % de la proteína que consume la humanidad, constituyen un alimento de baja cantidad y calidad proteínica. Del valor nutritivo, la **FAO, 1990**, afirma que la mayor deficiencia del maíz consiste en que contiene poco Triptófano y lisina.

Luego de revisar ampliamente las publicaciones sobre el proceso del mejoramiento del maíz, **MA, 1978**, cita en su publicación que el programa del aumento de la concentración de las proteínas en las semillas fue iniciado en maíz (***Zea mays*, L.**) por HOPKINS en 1899. Asegura que después de 70 generaciones de selección para alto porcentaje de proteína, se observó un incremento de 10.9% a 25.2 %, sin embargo la cantidad de **Zeina**, pobre por su calidad nutricional, fue la que se incrementó. Por consiguiente el valor nutritivo del maíz obtenido fue más bajo que el esperado, basado en el incremento del porcentaje de proteína.

En las revisiones sobre las investigaciones alrededor del maíz Opaco, **BAUMAN, 1977**, afirma que desde que MERTZ y col., descubrieron en 1964 que el gene Opaco-2 mejoraba la calidad proteínica del maíz, el avance en la investigación sobre el uso de tipos de plantas con mejor calidad proteínica se ha limitado y las razones que expone son:

1. El Opaco-2, es un gen recesivo simple, que influye sobre varias características de la calidad de la semilla, que son cuantitativas en su

herencia: (El aumento en la **calidad** de la proteína implica una disminución en el **rendimiento**; son inversamente proporcionales).

2. El bajo rendimiento y el endosperma suave que no son aceptables para ciertos usos culinarios; la mayor susceptibilidad a insectos, las pudriciones en la raíz, los problemas en la recolección de la cosecha y en el almacenamiento del maíz.

Las investigaciones de **BAUMAN, 1977**, quien cita a LAMBERT y otros investigadores coinciden en sus resultados, mostrando que el maíz OPACO tiene mayor cantidad de aceite que el maíz normal y se debe principalmente a que el germen ocupa una mayor proporción de la semilla, en virtud del menor tamaño del endospermo. Las correlaciones encontradas entre porcentaje de proteína y los elementos minerales fueron positivas y significativas para ambos tipos de semillas de las poblaciones heterocigotas. La alta concentración de Lisina está correlacionada de manera importante con los contenidos de fósforo, magnesio, hierro y zinc.

Aparte de las investigaciones sobre el gen Opaco, **MA, 1978**, cita a numerosos investigadores, entre los cuales sobresale NELSON y colaboradores quienes en 1965, encontraron un gene mutante que efectúa el incremento de Metionina en semillas de maíz, reportando que dos factores contribuyeron a ello: **1.** El incremento del contenido de glutelinas debido a la acción del gen **floury-2**. y **2.** El decrecimiento de la proporción Prolamina / Glutelina en la fracción.

Según **MUÑOZ, 1993**, la permanente recombinación genética del maíz no permite que se establezcan rígidamente sus caracteres varietales cuantitativos y aún en el caso de caracteres determinados por pocos genes es usual observar segregaciones. Esta variación persistente es más común en aquellos caracteres que no se someten a ninguna presión de selección en el proceso de mejoramiento.

FRIJOL, *Phaseolus, vulgaris, L*

El frijol, ***Phaseolus vulgaris* L.**, es una planta Dicotiledónea con $2n = 22$ cromosomas. Normalmente se autopoliniza (autógama) y presenta un bajo porcentaje de polinización cruzada.

El origen americano, del frijol común, según las publicaciones **CIAT, 1975**, se acepta sin el menor asomo de controversia. Investigaciones arqueológicas han permitido ubicar restos en diversos sitios de América, (En Puebla (México), con 7000 años de antigüedad; en el Callejón del Huaylas (Perú), fríjoles completamente domesticados con rangos de edad

entre 7680 y 10.000 años de antigüedad). Se encontraron 30 especímenes que corresponden a frijoles de grano rojo-marrón oscuro y rojo oscuro; también había granos moteados, algunos de forma redonda otros planos, alargados y arriñonados. Esto nos demuestra que desde tiempos inmemoriales el hombre recolectó y de alguna manera mejoró los materiales nativos y los domesticó, seleccionando los que encontró que presentaban las mejores características para su alimentación.

En sus investigaciones **CIAT, 1989**, encontró que durante el proceso de evolución del frijol bajo cultivo, ocurrieron dos cambios mayores al nivel morfológico: En primer lugar la morfología de las plantas se apartó mucho de la de las plantas silvestres (se afectaron el hábito de crecimiento, el sistema de dispersión de la semilla o sea la estructura de las vainas y las cualidades de la semilla: Tamaños, formas y colores diferentes). En segundo lugar las formas cultivadas presentan un grado de diversidad morfológica más amplio que las formas silvestres. Esto refleja la diversidad cultural de las sociedades humanas que han cultivado el frijol.

En frijol, se ha encontrado gran variación de los tipos de frijoles, en lo que respecta a su hábito de crecimiento, los ambientes de producción, y los sistemas de cultivo, cada uno de los cuales puede afectar la capacidad de rendimiento de los cultivares.

El fruto del frijol es una legumbre, es decir, un fruto de un solo carpelo cuya placenta ventral se abre en la madurez por sí sola para que puedan salir las semillas. La legumbre es aplanada, curva o recta, con ápice encorvado o recto. El color depende de la variedad y varía entre verde uniforme o morado a casi negro. Al secarse la vaina la capa de fibras produce su dehiscencia y da la torsión característica de las vainas secas.

La semilla en el frijol común tiene formas muy diferentes, desde esférica hasta casi cilíndrica. La coloración externa, también varía mucho, de negro a blanco (pasa prácticamente por todos los colores) y puede ser uniforme, jaspeada, punteada o manchada. La semilla propiamente dicha está constituida principalmente por dos cotiledones epigeos formados por parénquima de alto contenido de almidón y proteínas.

El máximo rendimiento experimental, **OPSA, 1989**, se estima en 5000 kilos por Ha, en condiciones óptimas y de monocultivo pero los rendimientos más altos logrados por agricultores rara vez alcanzan los 2000 Kilos en condiciones similares. Además el rendimiento promedio mundial de frijol es de apenas 600 kilos/Ha. En Colombia el cultivo es generalmente tradicional o rudimentario, utilizando semillas no mejoradas y obteniendo bajos rendimientos, (entre 650 Kilos y 1200 Kilos por hectárea, con semilla tradicional y mejorada, respectivamente).

polinizaciones, (en el invernadero produjeron un mayor número de semillas por vaina que en el campo).

Según los trabajos de **TEMPLE y SONG, 1980**, es esencial que el mejoramiento genético de *Phaseolus vulgaris* para condiciones tropicales, esté basado en prioridades, tales como las obtenidas de las estimaciones de las pérdidas de rendimiento registradas por cultivadores y las evaluaciones de los factores y las estrategias alternativas.

POLIGNANO, 1982, recomienda que para iniciar estudios y trabajos previos de mejoramiento de la proteína en frijol común, los fitomejoradores deben tener cuidado en y durante su investigación dos aspectos muy importantes:

1. Identificar líneas de **altos rendimientos** que tengan incremento en el **porcentaje de proteína** de la semilla.
2. Seleccionar individuos con alta concentración de Metionina y Cisteína.

Según los trabajos de **POLIGNANO, 1982**, numerosos estudios se han realizado sobre la heredabilidad de estos caracteres y cita las investigaciones realizadas por LANTZ, GRUGH y CAMPBELL, 1958; BOND, TOYNBEE-CLARCK y POPE, 1976; RAMANUJAM, 1975.

También analiza que estudios paralelos sobre algunas características de las plantas mejoradas de frijol, muestran amplia coincidencia en las investigaciones, que señalan **bajos o moderados valores de heredabilidad para las características cantidad de proteína y producción** en las cosechas y cita las actividades de COYNE, 1968; PORTER, 1972; KELLY y BLISS, 1975.

De igual manera **POLIGNANO, 1982**, reconoce que ha encontrado dificultades cuando necesitaba mejorar los rendimientos en las cosechas y los porcentajes de proteína simultáneamente. Cita además que muchos investigadores RUTGER, 1970, LELEJI et al, 1972, CHEAL y EVANS, 1973; KELLY y BLISS 1975 también han encontrado una correlación negativa entre estos dos aspectos claves del mejoramiento del frijol,

El mismo autor, indica varias alternativas a los métodos tradicionales de mejoramiento que ya han sido probadas y logrados en soya y cita los trabajos de BRIM, 1973; SHARMA y GREEN, 1975 para explorar las posibilidades de incremento del porcentaje de proteína y cosecha. Se encontró un método de selección recurrente que incluye así mismo el entrecruzamiento de los mejores genotipos promisorios, porque ofrece la posibilidad de combinar algunas fuentes de genotipos superiores sobre los cuales practicar la selección por caracteres con baja o moderada heredabilidad como porcentaje de proteína y rendimiento de grano.

Este método, denominado Semilla Sola por Descendiente (**SSD** parece ser muy interesante porque puede ayudar a mantener la varianza genética. Sin embargo en frijoles como en cereales, se puede obtener una planta de una semilla en relativamente corto tiempo. Además cita los resultados obtenidos por BLISS, 1978; EVANS y GRIDLEY 1979, quienes sugieren que la labor debe ser realizada en generaciones tempranas porque una selección oportuna puede identificar plantas con altas proteínas individuales dentro de las familias. Para generaciones sucesivas es posible seguir usando el método SSD.

Las metodologías según **VOYSEST, 1985**, más utilizadas por el CIAT, para selección y evaluación de poblaciones cruzadas en Frijol son:

- **Masal-pedigrí:** Las generaciones tempranas avanzan masalmente, sin mucha selección hasta las generaciones F4 ó F5, para posteriormente entrar a una fase de selección de plantas individuales similar al método del pedigrí. La selección masal en cada generación se puede hacer cosechando una sola vaina o la semilla de cada planta o cosechar todas las plantas y luego tomar una muestra representativa de las semillas para su siembra en la siguiente generación.
- **Retrocruzamiento:** Las características seleccionadas de alta heredabilidad con frecuencia se transfieren del progenitor (o progenitores) donante a un cultivar comercial sobresaliente (el progenitor recurrente). El híbrido resultante se cruza nuevamente con el progenitor recurrente, por varias oportunidades, hasta volver a recuperar la mayoría de los genes del progenitor utilizado inicialmente. Este método es bastante seguro pero se aumenta el número de cruzamientos y con frecuencia no conduce a cultivares diferentes al padre recurrente.
- **Mejoramiento por introducción y selección:** El mejoramiento por introducción y selección no es otra cosa que la importación del material genético. El estudio sistemático de estos materiales importados puede rendir los mismos beneficios que se pudiera lograr con los métodos de mejoramiento convencionales. También pueden beneficiarse los programas con las introducciones, utilizándolas como reservorio de germoplasma para los trabajos de hibridación.

En su trabajo en el Programa de mejoramiento del frijol en el CIAT, **SINGH, 1985**, afirma que el **mejoramiento** de plantas, se puede definir como el desarrollo de cultivares genéticamente superiores con buenas características agronómicas. La base de un programa de mejoramiento genético es la existencia de variabilidad genética, sin ella no se podría

lograr progreso alguno. Los cultivares obtenidos deben aumentar el rendimiento, bajar los costos de producción, ser de ciclo corto y superar la calidad culinaria de los parentales utilizados.

SINGH, 1985, aclara en sus investigaciones, que en frijol, la mayoría de las características morfológicas, el hábito de crecimiento, la resistencia a la antracnosis y al virus del mosaico común tienen **alta heredabilidad**. La resistencia al añublo bacteriano común, añublo de halo y a la mancha angular, la madurez, el tamaño de la semilla, podrían considerarse como características de **heredabilidad moderada** y si las técnicas de selección son confiables, se pueden hacer selecciones por estas características desde las generaciones tempranas.

DAVIS, 1985, en sus trabajos sobre genética del frijol afirma que los genes de cada par alélico son normalmente idénticos, **homocigotes**. (Un **gen** es el factor heredado que determina una característica biológica). Los genes existen en pares en cromosomas equivalentes. Los dos genes de cada par se conocen como alelos. Los genes que se encuentran en el mismo cromosoma son ligados. Si los alelos no son iguales, como resultado de cruces entre dos plantas de frijol diferentes, se dice que la planta es **heterocigota**. Cuando una planta heterocigota no se diferencia de una homocigota, se dice que uno de los genes de cada par alélico es **dominante**, tales como hábito de crecimiento, brillo u opacidad de la testa, resistencia al BCMV (Virus común del mosaico del frijol)

También asegura que el grado de **ligamiento** entre los genes, en el mismo cromosoma, depende de la distancia entre ellos y de la frecuencia del **entrecruzamiento** (el mecanismo genético para la recombinación de caracteres controlados por genes en el mismo cromosoma) entre cromosomas equivalentes que afectan el vigor de la plántula, color de la semilla y resistencia a razas de antracnosis. Se habla de ligamiento genético cuando se encuentran caracteres asociados (correlacionados) con otros caracteres (vigor de la plántula y color de la semilla; resistencia a razas de Antracnosis).

De acuerdo con su grado de interacción con el medio ambiente, los caracteres descriptivos se diferencian en **cualitativos y cuantitativos**:

Los **caracteres cualitativos** dependen generalmente de uno o de pocos genes que determinan una característica de distribución discreta, es decir de fácil diferenciación entre las posibles alternativas fenotípicas, (por ejemplo, color de la flor y hábito de crecimiento). Estos caracteres no pueden ser medidos numéricamente o se dificulta su medición en cuanto incluyen un grado de subjetividad en la evaluación (por ejemplo, color, intensidad, forma, orientación).

Los **caracteres cuantitativos**, según **DAVIS, 1985**, son influenciados en frijol ampliamente, por el medio ambiente, de tal manera que estos varían según la localidad y la época y por tanto **son de baja heredabilidad**. Estos caracteres son los de mayor importancia para el mejoramiento del frijol, porque se ha encontrado que controlan el tamaño de la planta, la calidad de la proteína y la producción. Estos caracteres (como por ejemplo el rendimiento y la altura de la planta), son controlados por varios o muchos genes, y cada uno de estos **producen efectos pequeños y acumulativos**, es decir, cada carácter está determinado por la acción conjunta de más de dos pares de genes menores, los cuales producen un efecto pequeño y aditivo sobre la expresión del carácter en estudio. Los efectos del ambiente e interacciones genotipo y medio ambiente reducen la eficiencia de la selección para un carácter como rendimiento.

El programa de mejoramiento de germoplasma para el frijol seco en el CIAT, **BEEBE, 1989**, enfatiza la selección progresiva en muchos ambientes diversos, en los cuales los materiales son confrontados por una amplia gama de factores adversos. Los programas especiales de arquitectura de la planta, potencial de rendimiento y mejoramiento de adaptación, así como de resistencia a enfermedades y plagas específicas, complementan las actividades principales.

Esto implica que el material vegetal debe ser objeto de una **descripción varietal**, que precisa de datos tomados con exactitud, de muchas características botánicas; pero para el caso de un fitomejorador con fines de promoción comercial, solo necesita realzar las características de interés agronómico y comercial que tienen importancia para el agricultor.

MUÑOZ, GIRALDO y FERNANDEZ, 1993, citan en su publicación que de acuerdo con la definición que da la **Association of Official Seed Certifying Agencies (AOSCA)**, **variedad**, es “una subdivisión de una clase de planta, que es diferente, uniforme y estable: **Diferente**, en el sentido de que la variedad se puede identificar por una o más características morfológicas, físicas o de otro tipo que la distinguen de las otras variedades conocidas; **uniforme**, en el sentido que se puede describir la variación de las características esenciales y típicas y **estable**, por cuanto la variedad permanecerá sin cambios y ofrecerá un grado razonable de confiabilidad en sus características esenciales y típicas”. En este concepto pueden apreciarse la interacción genético-ambiental, la variabilidad de los caracteres varietales y los límites para cada especie y aún, para los diferentes métodos de mejoramiento utilizados en cada caso.

De igual manera afirman **MUÑOZ y col., 1993**, que las características de

las plantas se transmiten por las semillas, de generación en generación, cumplen con las reglas de la herencia que fueron encontradas por Mendel, y corresponden generalmente a la descripción varietal que se hace en el fenotipo observado de las plantas de una variedad y depende del potencial genético (**genotipo**) de la planta y de su expresión (**fenotipo**), que recibe los efectos ambientales presentes. Por tanto se debe conocer el fenotipo para tratar de diferenciar las variaciones debidas a los efectos genéticos de aquellas que ocurren por efectos ambientales, que no se pueden eliminar.

Las investigaciones realizadas por **MUÑOZ, GIRALDO y FERNANDEZ, 1993**, señalan que en la pureza varietal, interesa principalmente el componente genético o genotípico, ya que **los efectos ambientales no se transmiten por semilla**. Teóricamente, en el caso del fríjol, planta autógena o autofecundada, todas las progenies de una planta son de igual genotipo, por tanto, las variaciones observadas deben ser ambientales. **La semilla** es el órgano portador de las características genéticas de la planta que mantiene la pureza varietal. Por ejemplo, una segregación genética es un efecto debido al cambio en el genotipo; un efecto ambiental modifica el fenotipo pero no el genotipo.

En el caso del fríjol, que es una planta autógena o autofecundada debe esperarse menos variación que en el caso del maíz, que es una planta alógama o de polinización cruzada. Esto explica los menores coeficientes de variación observados entre plantas de las especies autógenas en comparación con las de las alógamas.

El **efecto ambiental** representa otra fuente de variación que se debe cuantificar para interpretar correctamente una descripción varietal. Cuando se considera una población o variedad, **MUÑOZ y col., 1993**, afirman que el fenotipo de cada planta dependerá de los efectos genéticos o ambientales que lo determinan, de manera que al cambiar cualquiera de los efectos o ambos, los fenotipos también cambiarán dando lugar a las variaciones que se observan en las plantas. No es suficiente medir el promedio de la expresión de un carácter; también es necesario identificar la variabilidad observada. Se ha considerado que dos desviaciones estándar como máximo representan una variación aceptable de la uniformidad de ese carácter.

Biotecnología:

Según las experiencias del CIAT en el campo de la investigación en fríjol, **ROCA, 1989**, el desarrollo de ciclos de cultivos de tejidos es el primer

paso, esencial, para desarrollar muchas aproximaciones para las técnicas biotecnológicas en frijoles:

- Un ciclo de cultivo de tejidos involucra el **establecimiento** de células **desdiferenciadas**, o tejidos cultivados bajo condiciones definidas (Nutricionales, Químicas y Físicas), **proliferación** de generaciones de células y posteriormente **regeneración** de plantas. En otras palabras un periodo de proliferación de células desdiferenciadas es inducido desde un explante (esto es la parte inicial de la planta) y seguida luego por la regeneración de las plantas.
- Aunque la desdiferenciación puede ser fácilmente inducida en frijoles, la fase de regeneración no lo es. La regeneración esta influenciada principalmente por el genotipo, clase de tejido usado como explante y las condiciones del cultivo. Es necesario concentrar todos los esfuerzos para resolver el problema de la regeneración **in vitro** en frijoles, (resistencia a los medios de cultivo actuales, para desarrollarse).

Ingeniería Genética:

Dada su enorme importancia económica, las plantas han sido objeto desde hace mucho tiempo del análisis genético dirigido al desarrollo de mejores variedades. El advenimiento de las técnicas del DNA recombinante ha introducido una nueva dimensión en ese esfuerzo, ya que las modificaciones genéticas que hacen posible estas técnicas son casi ilimitadas.

Las investigaciones de **FEDOROFF, 1984**, muestran que un **elemento genético transponible** es un trozo de ADN que puede desplazarse de un sitio a otro del genoma de un organismo. Se escinde de una posición y se inserta en otra, sea en el mismo o en diferente cromosoma. Asegura también, que el movimiento de un elemento transponible puede dar origen a reestructuraciones cromosómicas y afectar con ello la expresión de otros genes.

Confirma en sus trabajos, lo que abundantemente han confirmado numerosas investigaciones en maíz y cita los importantes trabajos de **McCLINTOCK** quien descubrió en 1940 cromosomas salpicados de estos elementos móviles que llamó "**genes saltarines**", además postuló la capacidad que tienen para modificar su expresión, la estructura de otros genes y la estructura de un genoma entero, lo que constituye un mecanismo importante que interviene en el cambio genético a largo plazo, punto crucial de la evolución orgánica.

Además de inactivar algunos genes, los elementos **transponibles** pueden ponerlos en marcha o potenciar su expresión. Hay razones para sospechar **FEDOROFF, 1984**, que también pueden reprogramar los genes de modos más sutiles, cambiando el momento y el lugar de su activación. Afirma que una expresión génica de estructura muy parecida a la que se observa en el maíz, se da también en otras plantas y animales: No es aventurado sospechar que los mecanismos genéticos básicos responsables de tales estructuras se asemejan a los descritos en el maíz.

En general, según **SUZUKI, 1992**, la Ingeniería Genética consiste en la programación de la alteración del material genético de un organismo vivo, mediante el desarrollo y utilización de técnicas que permiten la **inducción** de mutaciones, deleciones e inserciones en fragmentos clonados de DNA, así como la alteración de pares de bases específicos.

La mejora ya no se limita a la selección de variantes de una misma especie. Ahora puede introducirse DNA de otras especies de plantas, animales o incluso bacterias. En el caso de las **plantas transgénicas**, todos los vectores derivan de la bacteria del suelo **Agrobacterium tumefaciens** que produce tumores en la planta a través del plásmido inductor **plásmido Ti**.

Injertos:

Injertar consiste en transferir mediante cirugía vegetal parte de una planta a otra con la cual tiene **afinidad taxonómica**, de modo que se establezca entre ambas una unión orgánica. También se ha reportado **PENNOCK, 1972**, que el arte de injertar se remonta por lo menos a varios siglos AC, pues se han encontrado escritos en sánscrito arcaico, refiriéndose al injerto de aproximación en el cultivo del mango. Virgilio también menciona el arte de injertar y Plinio el Viejo describe el injerto de cuña con lujo de detalles y señala además muchas de las precauciones que deben observarse, algunas de las cuales concuerdan básicamente con los conocimientos actuales.

PENNOCK, 1972, afirma que el injerto se practica con el fin de **propagar plantas vegetativamente** y así retener los caracteres deseables de aquellas variedades de plantas que no se reproducen fielmente al propagarse por semilla sexual. También sirve para combinar en una sola planta ciertos caracteres que radican en forma individual en plantas diversas y que se pueden unir.

Son tantas las formas de injertar que existen y tantas las modificaciones

de muchas de estas clases que se ha optado por clasificarlas de acuerdo al tipo de **superficie de unión** entre las partes.

Según su publicación, **PENNOCK, 1972**, hay tres tipos de superficies que pueden utilizarse para formar la unión de los injertos:

- La superficie interna de la corteza (Tejido del liber).
- El tejido superficial de la madera de los tallos (albura).
- La cara superficial que incluye varios tejidos del corte del tallo.

El éxito del injerto consiste en lograr la mejor aproximación y/o confrontación posible entre **los bordes recortados del cambium** con la exactitud requerida para obtener una unión sólida entre los tejidos.

Sin embargo los resultados mencionados anteriormente, no concuerdan con los obtenidos en trabajos reportados sobre experimentos recientes con injertos en plantas, los cuales son citados por **OHTA, 1991**, que analiza como fueron realizados los trabajos en pimiento rojo, ***Capsicum annum L.*** por KASAHARA y col., en 1973.

Repitió nuevamente los injertos mencionados, y observó que se produjeron variaciones similares a aquellas publicadas por la literatura y cita especialmente los trabajos de YAGISHITA y col., 1990; HIRATA y YAGISHITA en 1989; PANDEY, 1976, de quienes dice que solamente describieron las variaciones obtenidas en el injerto genético. Sin embargo, **OHTA, 1991**, analizó y profundizó los resultados de sus investigaciones y usando el procedimiento Mendeliano, encontró las características de los cambios genéticos inducidos por el injerto genético.

En vista de los resultados obtenidos en sus experimentos se permitió clasificarlos en dos grandes grupos **FIGURA No 1**, a los cuales llamo:

- **Injerto hortícola:** Es un injerto realizado entre plantas de especies afines, para tratar de obtener un mejor crecimiento, como en el caso de muchos arboles frutales y arbustos florales donde el portainjerto sirve como un sistema que posee sus propias raíces con ramas y hojas. En esta condición el injerto crece vigorosamente, sobre el portainjerto, con sus propias ramas y hojas. En el caso de injerto hortícola, hay un efecto fisiológico del portainjerto sobre el injerto, pero efectos genéticos no ocurren excepto para posibles quimeras.
- **Injerto genético:** Es un tipo de Injerto en donde el portainjerto sirve como un hospedero teniendo sus propias raíces, ramas y hojas vigorosas. Pero en este caso el injerto, sin sus propias ramas ni hojas, crece sobre el portainjerto como si fuera un parásito.

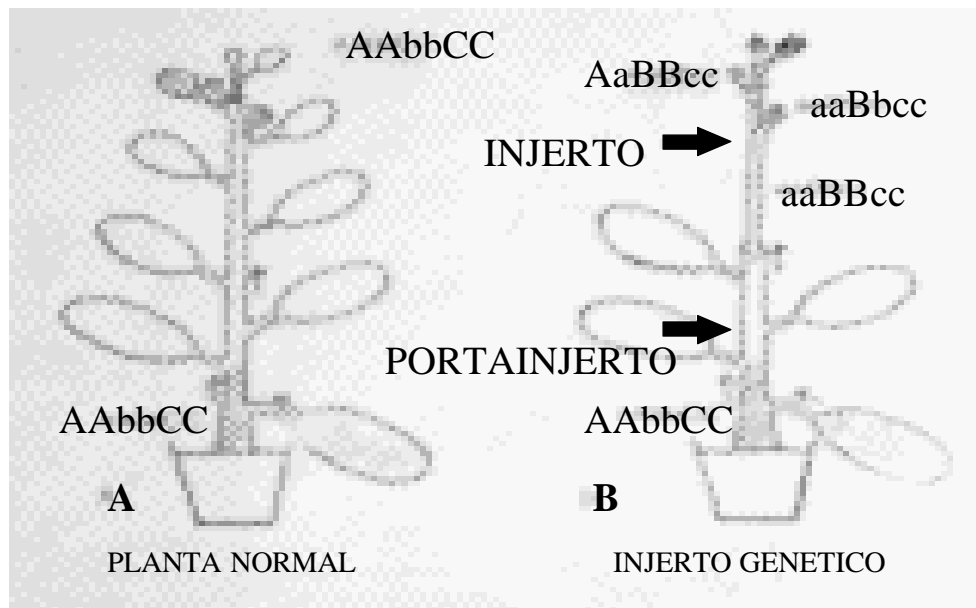


FIGURA 1. Diagrama que muestra la comparación entre una planta control A y una planta a la cual se le ha realizado el injerto genético B. (En : Graft-transformation the mechanism for graft-induced genetic changes in higher plants. Euphitica 55:91-99 1991, por Yasuo Ohta.).

Según **OHTA, 1991**, los análisis microhistológicos de los tallos portainjertos de *Capsicum annuum L.*, revelaron que masas de **cromatina**, (Tradicionalmente las proteínas de los Eucariotas que se unen al DNA se clasifican en dos grupos: las **Histonas** y las *Proteínas cromosómicas no-Histónicas*. El complejo formado por el DNA cromosómico y las dos clases de proteínas se denomina **cromatina**. **BRUCE, 1994**), de varias formas y tamaños **se movilizaron** entre las paredes y el espacio intercelular de las células a través del sistema vascular en la unión del injerto y del portainjerto, a los primordios florales o puntos de crecimiento de los injertos.

Como conclusiones de sus investigaciones **OHTA, 1991**, anotó que:

1. Los cambios obtenidos son al nivel genético, y son posibles en ambas direcciones, de dominante a recesivo y de recesivo a dominante.
2. El cambio mas usual es de homocigoto a heterocigoto (un alelo cambiado), pero algunas veces este puede ser de homocigoto dominante a homocigoto recesivo (ambos alelos cambiados a la vez).
3. Una variación individual puede implicar un cambio en un solo gen o de varios genes en diferentes cromosomas.

4. La proporción de ocurrencia de cambios varia ampliamente de un experimento a otro: la repetibilidad no es una constante.
5. La proporción total de ocurrencia de variaciones fue del 0.84 %, las variaciones usualmente son simples, pero en una instancia, todas las semillas dentro del fruto ganaron variaciones.
6. En el caso de 2 genes complementarios ambos genes siempre cambian al tiempo.
7. Las características cambiadas son usualmente estables en la variación pero algunas veces inestables causando mosaicos quiméricos de ciertos rasgos en una sola planta.
8. Afirma que los cambios inducidos por esta clase de injerto y por tratamientos con DNA, fueron exactamente los mismos. que encontraron NAWA y col, en 1975

Por otro lado, **WHITE, MONTES y MENDOZA, 1992**, observaron que el enanismo que se presenta cuando hay cruzamientos entre frijol común, de diferentes centros de origen, restringe los cruzamientos entre los pools de genes, y puede ser fácilmente controlado cuando se injertan híbridos F1 sobre plantas de frijol resistentes al enanismo.

También afirman en sus estudios que se ha encontrado que este procedimiento de injertar plantas es una gran ayuda para estudios de evolución de fenotipos fisiológicos, al caracterizarlos por la presencia de los alelos **DI-1 o DI-2** y producir vástagos normales en plantas. Sin embargo, en los experimentos realizados se encontraron algunas plantas que mostraban resultados **mezclados o diferentes** y que no respondían a lo esperado. Experimentos adicionales confirmaron la ocurrencia de materiales que tienen respuestas mixtas o muestran enanismo, sin importar la combinación del injerto.

Estos autores finalmente concluyen que mientras el injerto tenga utilidad como herramienta de screen, los resultados deben interpretarse con cuidado. Hace falta determinar si los **inexplicables resultados** reflejan efectos de adición de alelos o genes afectando la respuesta al enanismo. Los injertos fueron usados sucesivamente para obtener vástagos normales F 1 y últimamente para producir semillas F 2 después de dos ciclos de Retrocruzamiento (**BC₂**) para 4 cruces que de otra manera podrían ser plantas enanas.

Los estudios realizados por **GOLECKI y col., 1998**, señalaron que en los **injertos interespecíficos e intergenéricos** realizados en Cucurbitáceas, se observó fuerte evidencia de la movilidad de proteínas estructurales del floema, **P1 y P2**, a través de los injertos. Afirmaron que la formación de puentes continuos del floema a través de la unión del patrón-injerto es

prerrequisito estructural para el transporte de proteínas o de sus precursores por el floema del injerto y llevados hasta el ápice del mismo.

En el mismo estudio, afirman los investigadores, que la translocación de estas proteínas era un fenómeno universal para Cucurbitáceas, tal como lo demostraron para 11 combinaciones de injertos. Señalan en su estudio, que hay plantas donadoras, donadoras-aceptoras y simplemente aceptores de proteínas.

Heteroinjerto Bernal, (Sistema Químico Biológico, SQB)

Según **BERNAL, 1979**, “El Sistema Químico Biológico, SQB, es un procedimiento que comprende una nueva metodología de trabajo con las plantas, que permite realizar en un medio químico un cruce entre dos plantas, denominadas parentales, sin tener en cuenta su **clasificación taxonómica**, obteniéndose como resultado una variedad mejorada, en menor tiempo y con mayor efectividad que cuando se cruzan plantas por medio de la polinización artificial”.

BERNAL y MORENO, 1981, luego de muchas observaciones en el campo (realizó más de 200 cruzamientos SQB desde 1961- 1981) y de la comparación de los análisis químicos realizados a las plantas originales frente a las plantas por él obtenidas, afirmaron que **las características** que muestran las plantas obtenidas usando el mencionado procedimiento, son muy especiales y las resumieron en las siguientes hipótesis:

1. Presentan mayor adaptación a diferentes ambientes: Clases de suelos, rangos más amplios para temperatura y humedad.
2. Hay variación notable en los valores dados por los análisis bromatológicos que muestran incremento en el valor de la materia seca, en el porcentaje de proteína y en los minerales.
3. Presentan mayor resistencia en campo al ataque de plagas y enfermedades: En cultivos sin aplicación de agroquímicos se cuantificaron mayores porcentajes de plantas en lecturas de plantas al momento de Emergencia, Floración y Cosecha.
4. Hay incremento notable en la producción y productividad del cultivo: Semillas con mayor peso, plantas con mayor producción y cosechas con mayores rendimientos por unidad de superficie.

El sistema Químico Biológico, **BERNAL Y MORENO, 1981**, presentaría por tanto algunas **ventajas** frente a las actuales técnicas de la Ingeniería genética y la hibridación artificial:

- Las semillas obtenidas en estas plantas sometidas a la metodología SQB (planta madre modificada), corresponden teóricamente a la F1, son fértiles, (alto porcentaje de germinación), y las plantas obtenidas se comportan como variedades y no como híbridos.
- El tiempo necesario para obtener estas modificaciones en las plantas objeto de mejoramiento es el correspondiente al ciclo de vida de la planta seleccionada.
- Los requerimientos económicos, de personal científico y los equipos utilizados para obtener estas plantas modificadas, son mínimos, comparados con los exigidos por la tecnología actual.

A partir de 1994, fecha en la cual se inició el Programa de Investigación en la Pontificia Universidad Javeriana, sobre las Características que presentan las plantas obtenidas con esta metodología, se decidió estudiar todo lo referente al mencionado Sistema Químico Biológico, SQB, y se empezó por aclarar que esta metodología consiste básicamente en un injerto modificado de raíz, **MORENO, 1994**, por lo cual se ha propuesto denominar este procedimiento **Injerto Bernal** cuando se realiza entre plantas de la misma especie y **Heteroinjerto Bernal (HIB)**, cuando se realiza entre cultivariedades de diferente especie.

Proteínas:

Según **ISHINO y ORTEGA, 1975**, el estudio de las proteínas en semillas de leguminosas fue iniciado por OSBORNE en el año de 1894. Las **globulinas**, (proteínas de forma globular solubles en soluciones acuosas), fueron identificadas inicialmente de acuerdo a su solubilidad en diferentes concentraciones de soluciones salinas y por diferentes temperaturas de coagulación. Los autores encontraron que las globulinas en general, constituyen la mayor porción de las proteínas de las semillas de leguminosas y en las especies vegetales muestran diferencias en cantidad.

Los reportes de **ISHINO Y ORTEGA, 1975**, señalan que el patrón de bandeamiento de la globulina fue similar en 7 cultivares estudiados del frijol rojo Kidney ***Phaseolus vulgaris L.*** También mencionan, que la mayor banda electroforética observada fue la del componente **G1 (Vicilina)**, que es la proteína de reserva presente en mayor cantidad en la semilla madura de frijol.

MA Y BLISS, 1978, mencionan los estudios realizados por ROMERO y col., en 1975, sobre el extracto crudo de proteína de la semilla de frijol,

que está constituida principalmente por albúminas y globulinas, y representan el 40% y el 60 % respectivamente, de la proteína total, de igual forma pretendieron resolver la discusión sobre el nombre de las proteínas analizadas y propusieron usar las notaciones Globulina-1 (**G1**) y Globulina-2 (**G2**), cuando se referían a las Globulinas de las semillas de frijol *Phaseolus vulgaris L.* Pero como mencionan en el reporte, el uso de esos términos comunes para la clasificación de las globulinas obtenidas de semillas de diferentes especies de plantas no es recomendado, porque las Globulinas individualmente no se han caracterizado suficientemente.

Los experimentos de **MA y BLISS, 1978**, mostraron que la proteína **G-1** ocupa una única posición sobre SDS- Acrilamida (Rf valores: 0.52 a 0.60) y los polipéptidos de la **G-2** fueron más pequeños que los de la **G-1** y tuvieron valores Rf entre 0.69 a 0.74. Los resultados señalaron lo siguiente: La separación de proteínas revela un perfil de proteínas en que la **G-1** fue la mayor fracción (cerca del 40% de la proteína del cotiledón), seguida en importancia por la fracción soluble en álcali 25 %, conteniendo Glutelina, Albúmina, Aminoácidos libres, **G-2**, Prolamina y residuos de fracciones.

BAGGA y col., 1992, citan los estudios de GEPTS y BLISS, en 1985, y confirman que una de estas globulinas, que se encuentra en mayor cantidad en semillas de frijol y denominada **faseolina**, juega un papel muy importante en la variabilidad que muestran algunos de los patrones electroforéticos de la proteína de la semilla de frijol, la cual es considerada hoy por hoy como una herramienta muy útil para los estudios de domesticación y distribución del germoplasma de frijol común.

Los estudios de **RAMOS, RIQUELME y PINTO, 1994**, citan los experimentos de McLEESTER en 1973, quien extrajo y fraccionó las proteínas de diferentes semillas de leguminosas y encontró dos que llamó Legumina y Vicilina. Señalan en su publicación, que están de acuerdo con lo reportado sobre los polipéptidos obtenidos en la electroforesis de la fracción de Globulinas y concuerdan en el hallazgo de su masa molecular con subunidades de **Vicilina, G1** (fracción proteica de 6.9 S que a pH neutro existe como un polímero de 140 KDa y que a su vez está formada por tres subunidades de 52, 49 y 46 KDa respectivamente) y la proteína **Fitoheماغlutinina, G2**, (es una fracción de 6.4 S y posee dos subunidades no idénticas con masa molecular de 34 y 36 Kda).

Cuantificación de proteínas:

Muchos métodos para estimación de la concentración de proteínas se han

desarrollado, y la selección apropiada del método depende básicamente de 5 criterios:

1. La cantidad de proteína disponible para el ensayo.
2. La concentración de la proteína en la muestra.
3. La especificidad del ensayo a realizar.
4. La presencia de compuestos químicos que pueden interferir con el ensayo.
5. La facilidad y confiabilidad de la ejecución del ensayo.

Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionó el método de **STOSCHECK, 1990**, que cumple con los requerimientos anteriormente enunciados. Este método, **espectroscopia**, se basa en la absorción de la Luz Ultra Violeta, por la muestra, tiene algunas ventajas:

- Puede ser efectuado directamente sobre la muestra sin tener que adicionar ningún reactivo.
- Se puede realizar rápidamente pues no se requiere incubación.
- La relación entre concentración de proteína y Absorbancia es lineal.
- Las proteínas absorben luz activamente en la región UV con dos máximos de 280 y 200 nanómetros (nm).
- El rango de sensibilidad para análisis de la concentración de proteínas en la muestra, está entre 20 y 3000 ug.

STOSCHECK, 1990, aclara sin embargo que aquellas proteínas que tienen pocos residuos de aminoácidos y tengan anillos aromáticos como Histidina, Tirosina, Fenilalanina y Triptófano, tienen baja absorbancia a 280 nm. Los **Acidos Nucleicos** absorben fuertemente a 280 nm; por tanto los extractos crudos de células conteniendo DNA y/o RNA producirán altos estimativos erróneos de proteínas. Para corregir las lecturas de absorbancia, por contenidos de Acidos Nucleicos, se deben leer las absorbancias a 280 nm y 260 nm.

Electroforesis:

ADRIAANSE, 1969, señaló que tal como DUNNILL y FOWDEN afirman y han puntualizado, la composición de las semillas no es afectada por la variación en los factores nutricionales de la planta o del medio ambiente, durante el crecimiento. Las semillas de las plantas han sido tomadas como material de estudio y una fuente estable y permanente para la extracción de las proteínas.

En *Phaseolus vulgaris L.*, la caracterización de cultivares ha sido

obtenida por densitogramas de patrones de proteínas que fueron evaluadas por electroforesis en geles de almidón de fracciones de proteínas obtenidas por simple extracción de las semillas con agua. Los experimentos indicaron que los patrones de proteínas no son afectados por factores externos tales como fertilización con Nitrógeno, condiciones climáticas y propiedades de los suelos.

LANDRY Y MOREAUX, 1970, afirman que en maíz, las fracciones de proteínas extraídas con sal son ricas en globulinas y albúminas, de igual forma las extraídas con agua. La fracción extraída con Isopropanol es rica en **zeína**, y la fracción extraída con SDS y Mercaptoetanol es rica en Glutelinas. Con cada fracción así obtenida se procedió a correr las respectivas electroforesis.

La **electroforesis** en gel de poliacrilamida, (PAGE) es una variable muy útil y de procedimiento ordinario, para el análisis de proteínas, La acción se basa en la estructura química entrelazada de la poliacrilamida que forma una trama porosa, a través de la cual se mueven las moléculas cargadas con velocidad proporcional al tamaño y peso. Tiene la ventaja sobre los demás soportes en que es transparente, y por lo tanto puede examinarse por medio de la luz ultravioleta y de la luz visible; además, como se puede controlar el tamaño de los poros, la separación se hace en base no solo a la carga sino al tamaño y la forma de las moléculas y así se puede obtener una mejor resolución.

La electroforesis consiste en tratar primero la muestra, sea una proteína pura o una mezcla, con el detergente aniónico sal sódica del hidrogenosulfato de dodecilo (SDS) antes de aplicar la electroforesis. El método se conoce tradicionalmente como SDS-PAGE. El SDS es un detergente iónico (con carga negativa), que “desenreda” la estructura plegada de la proteína. Este se absorbe a lo largo de la superficie de la cadena polipeptídica. La absorción de muchas moléculas de SDS con carga negativa en el polipéptido le confiere una carga negativa neta.

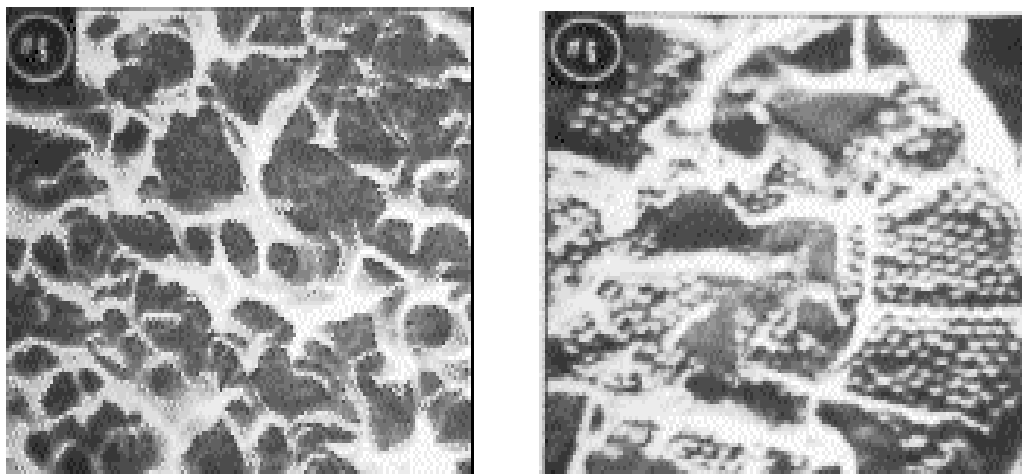
Según publicaciones de **MERCK, 1977**, los polipéptidos de diferentes tamaños absorben una cantidad de SDS proporcional a sus dimensiones. Se ha demostrado que ha concentraciones de SDS por encima de 8×10^{-4} mol/L son ligados 1.4g de detergente a 1g de proteína. Se forma entonces un complejo en forma de bastoncillo, cuya longitud depende del peso molecular del polipéptido. El resultado es que los polipéptidos de distintos tamaños tienen el mismo o casi el mismo valor Carga/tamaño.

También afirman que las proteínas en presencia de concentraciones elevadas de SDS, en la electroforesis con gel de poliacrilamida (PAGE), presentan movibilidades que son función directa del peso molecular de sus subunidades. Para calcular el peso molecular de las diferentes proteínas

presentes en la muestra se compara la movilidad electroforética de la proteína o péptido a investigar con la movilidad del patrón de proteínas de peso molecular exactamente conocido.

Comparando el maíz normal, *Zea mays L.* en análisis electroforéticos de proteínas en geles de almidón, se verificó, **BAUMAN, 1977**, que la matriz proteínica esta compuesta de **Glutelina** (fracción de la proteína de maíz rica en lisina y soluble en álcali). Los cuerpos proteínicos, en una sección de maíz y vistos al microscopio, consistían casi enteramente de **zeína** (fracción del maíz deficiente en lisina y soluble en alcohol). En contraste, los cuerpos proteínicos en la sección del maíz con alto contenido de lisina, son tan pequeños que casi son oscurecidos por la mayor cantidad de matriz glutelínica. **FIGURA No. 2.**

Estudios realizados por **BAUMAN, 1977**, han señalado que existen dos bandas que representan los mayores componentes proteínicos de la zeína, que tienen pesos moleculares de aproximadamente 22 y 25 KDa respectivamente. En algunos mutantes se ha encontrado que al disminuir la zeína se incrementaba fuertemente los niveles de Glutelina y el Triptófano.



MAIZ ALTO EN LISINA

MAIZ NORMAL

FIGURA No. 2. Microfotografías de secciones de endospermo de maíz con alto contenido de lisina (Opaco -2) y maíz normal. Los gránulos de almidón fueron removidos con amilasa. (Foto tomada de MAIZ DE ALTA CALIDAD PROTEÍNICA, Evaluación Química y Biológica de la calidad proteínica del maíz; Wall y Paulis, 1977).

En el estudio de **BAUMAN, 1977**, señala su concordancia con lo hallado por **FOSTER y col., MERTZ y BRESSANI, 1977**, donde se demostró que la mayoría de las proteínas del maíz podían ser solubilizadas no solo por

álcali, sino también por agentes reductores tales como sulfito o Mercaptoetanol en la presencia de agentes disociadores, tales como los dispersantes.

POLIGNANO, 1982, revisando las publicaciones sobre las técnicas de electroforesis, tal como las citan ROMERO y col., 1975. las cuales han demostrado ser una ayuda para examinar la distribución de las proteínas de almacenamiento en diferentes genotipos de frijol, informan que también es posible identificar indirectamente genotipos con alta concentración de aminoácidos sulfurados. También cita a MA y BLISS, 1978, quienes sugieren una alternativa estratégica para aumentar los aminoácidos sulfurados constituyentes del frijol para obtener el mayor valor nutricional, la cual puede ser el de seleccionar genotipos con alta proteína y con una alta proporción Globulina / Albúmina. En efecto ellos encontraron que la proporción de Metionina en la fracción de Albúmina soluble en álcali, en *Phaseolus vulgaris L.* fue aproximadamente el doble de la proporción en la fracción de Globulina.

El análisis electroforético para investigar las relaciones entre diferentes genotipos en generaciones tempranas parece ser muy útil, particularmente cuando el objeto es mejorar la calidad de la proteína, lo cual le permite afirmar que hay **la posibilidad de tratar las bandas electroforéticas como caracteres cualitativos** es la conclusión más interesante. Sin embargo, se necesita información sobre las siguientes generaciones para las cualidades consideradas, antes de que las conclusiones finales puedan ser dadas, **POLIGNANO, 1982**.

Afirma que la identificación de genotipos con la más alta producción y porcentaje de proteína es difícil en las generaciones tempranas F1, F2, especialmente cuando el examen está limitado a uno o dos ambientes. Sin embargo, los análisis de correlación entre peso de las semillas por planta y porcentaje de proteína mostraron alguna combinación con alto pero no con el más alto porcentaje de proteína.

POLIGNANO, 1982, luego de estudiar las electroforesis en geles de almidón, de las proteínas de las semillas de los parentales y las progenies de un cruce de frijoles y su cultivo en cámaras con condiciones controladas del medio ambiente, señaló que puede aparecer evidente que **la variación en el porcentaje total de la proteína en estas semillas de frijol es una consecuencia de la alteración de la cantidad de las fracciones específicas de proteína**. Cita además que, los genotipos con alto porcentaje de proteína están asociadas con un incremento en la cantidad de algunas subunidades especialmente la fracción **G-1**. Estos resultados en lo cual coincide con los estudios de MA y BLISS, 1978.

También afirma en su estudio que no se encontraron diferencias entre los genotipos cultivados en diferentes ambientes, puesto que los patrones de bandeamiento fueron invariables. El alto número de bandas observadas en los geles no permite un análisis genético confiable. Sin embargo hay alguna evidencia que sugiere que la variación en la presencia o ausencia de subunidades en la proteína de almacenamiento está bajo el control de unos pocos genes con herencia Mendeliano.

La investigación adelantada en fríjol, **POLIGNANO, 1982**, sobre la relación entre el peso de la semilla por planta y el porcentaje de proteína, señaló que **el porcentaje de proteína poseía alta heredabilidad y una mayor estabilidad sobre el efecto del medio ambiente**, frente a la variable peso de la semilla que mostró ser muy baja. También se observó una parcial dominancia para bajo porcentaje de proteína y bajo peso de la semilla.

Estudios hechos por **CIAT, 1989**, indicaron que la proteína era el factor que determinaba tanto la cantidad como la calidad de la proteína de la semilla. Electroforesis de 1 y 2 dimensiones en poliacrilamida, de formas silvestres y cultivadas de *Phaseolus vulgaris L.* tanto en Mesoamérica como en los Andes, mostraron que el hábito de crecimiento está fuertemente correlacionado con el tipo de faseolina y también con el tamaño de la semilla .

Investigaciones posteriores sobre la presencia de la faseolina en las formas silvestres y cultivadas del fríjol en los diferentes centros de domesticación, mostraron que esta proteína se podía utilizar como indicador evolutivo.

El estudio electroforético de la **faseolina** ha mostrado hasta la fecha 22 patrones electroforéticos, algunos de los cuales están estrechamente relacionados con las zonas geográficas de origen del fríjol. De los tipos de faseolina descritos, vale mencionar el tipo S (Sanilac), proveniente de la región Mesoamericana; el tipo T (Tendergreen) proveniente del sur de los Andes y el tipo C (Contender) proveniente de una parte intermedia entre Mesoamérica y el sur de los andes. El estudio de la faseolina en una colección de fríjol del Este del Africa demostró que en la mayor parte de esos materiales fueron introducidos originalmente del sur de los andes. **CIAT, 1989.**

Esto permite seguir la diseminación de variedades entre un centro de domesticación y otro, y desde los centros de domesticación hacia otras regiones del mundo. En Colombia, según el **CIAT, 1989**, se encontró un

gradiente geográfico en la frecuencia de varios tipos de faseolina: En la región noroeste predomina los tipos Mesoamericanos, mientras en el suroeste los tipos andinos se encuentran en mayor abundancia.

Según **BOHINSKI, 1991**, muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica, la magnitud de la cual depende de la proteína, del pH y de la composición del medio en que se halle. Si a una solución de moléculas cargadas se le aplica un campo eléctrico, las moléculas migran a los electrodos de polaridad opuesta. Este principio se usa en electroforesis para separar moléculas que poseen cargas diferentes.

La solución de proteína es dializada primero en una solución **buffer** (una solución salina amortiguadora con pH y fuerza iónica definidas), que sirve como medio conductor de electricidad en el momento en que se aplica un voltaje externo, contra un medio de soporte que contiene la proteína. Los medios de soporte más usados son: papel, acetato de celulosa, gel de agar, gel de almidón, gel de poliacrilamida.

En un medio de viscosidad constante y con voltaje también constante, el desplazamiento de una molécula cargada depende de la proporción carga/tamaño. El grado de movimiento de cada molécula cargada, dentro del campo eléctrico se denomina **movilidad electroforética**.

La porosidad de la matriz del gel implica que la migración electroforética reflejará de una manera muy exacta las diferencias dimensionales de los iones en movimiento. Los geles de agarosa y de poliacrilamida son los más ampliamente utilizados. Estos geles constan de cadenas poliméricas ligadas entre sí, lo que le confiere a la matriz una índole porosa. Los geles de agarosa tienen los poros muy amplios y los de poliacrilamida los tienen pequeños, además, es posible controlar el grado de interconexión entre las fibras para lograr poros uniformes de cualquier medida.

RAMOS, RIQUELME Y PINTO, 1994, en el estudio de los geles de almidón sobre los cruces citados por POLIGNANO, 1982, afirman que no fue observada influencia paternal o maternal puesto que todas las semillas de las plantas F1, mostraron patrones intermedios. Similares resultados han sido observados por ROMERO y col., 1975, acerca de la variación en la herencia de la mayor proteína de almacenamiento **G1**. Ellos también encontraron que la variabilidad en la subunidad grande de la proteína **G1** está bajo el control de un gen simple con herencia mendeliana.

Afirman que el contenido de proteínas solubles, en su estudio de 11 variedades de frijol, las globulinas constituyen la mayor fracción de las proteínas de la semilla frente a las albúminas. La disociación de la fracción de albúminas por electroforesis mostró mayores diferencias entre

las variedades que la fracción de globulinas. Esto confirma el uso de esta técnica para la identificación rápida y confiable de las variedades de esta especie.

Experimentos realizados por **ADRIAANSE, KLOP Y ROBBERS, 1969**, indicaron que **los patrones de proteínas no son afectados por condiciones externas** tales como fertilización con nitrógeno, condiciones climáticas y propiedades del suelo.

Digestibilidad:

Según la **FAO, 1990**, la expresión **calidad proteínica** se utiliza para expresar la eficacia de una proteína como promotora del crecimiento. Está sometida a la influencia de diversos factores, el principal de los cuales es conocer si la proteína contiene los aminoácidos esenciales en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades humanas. En el caso de las proteínas de las leguminosas, los aminoácidos azufrados, la Cisteína y la Metionina, por lo general agrupadas, suelen definir su composición proteínica en relación con la norma. La concentración de Triptófano tiende asimismo a ser baja; el nivel de aminoácidos azufrados no llega a la norma en ninguna legumbre, (excepto en la soya que sí lo logra).

Aunque los aminoácidos son importantes para las pruebas de la calidad de una proteína, la digestibilidad de esa proteína es la primera determinante de la disponibilidad de sus aminoácidos. La biodigestibilidad de la proteína de un alimento puede ser obtenida ***in vivo*** realizando bioensayos con ratas pero esto es costoso y el procedimiento consume demasiado tiempo.

Según la publicación de **HSU, VAVAK, SATERLEE Y MILLER, 1977**, quienes retoman toda una serie de investigaciones sobre el sistema enzimático (solución de enzimas digestivas: Pepsina - pancreatina):

- Lo descrito por AKESON Y STAHMANN, 1964, quienes encontraron que tenía una razonable aproximación a la digestibilidad de la proteína.
- Los estudios de BYERS Y BUCHANAN 1969, quienes describieron un sistema ***In vitro***, para medir la digestibilidad de la proteína de la hoja de trigo concentrada, con una digestión enzimática utilizando papaína. Los parámetros obtenidos dieron resultados satisfactorios de acuerdo con los resultados ***in vivo*** para bioensayos con ratas.
- Los sistemas de enzimas anteriormente citados y que fueron reinvestigados por SAUNDER et al, 1973, (quienes desarrollaron un

sistema Papaina –Tripsina, y sus resultados *In vitro* mostraron una alta correlación con la digestibilidad *in vivo* de, $r = 0.91$), y encontraron que los valores obtenidos para el sistema enzimático mencionado *In vitro*, mostraba una excelente correlación ($r = 0.88$), con los datos obtenidos *in vivo*, mientras que los resultados de la digestión con papaína mostraron una baja correlación con los datos *in vivo*.

- Los estudios de MAGA et al, 1973, quienes puntualizaron que los valores iniciales de la hidrólisis por Tripsina, en algunas fuentes de proteínas usadas comúnmente, eran buenos indicadores de las digestibilidades de esas muestras.
- La publicación de **RHINEHART 1975**, que modificó el procedimiento de MAGA e investigó la correlación entre *in vivo* e *in vitro* de la digestibilidad de las proteínas. Examinó algunos sistemas que incluían Tripsina, Pepsina - Tripsina, Tripsina - Quimiotripsina y las combinaciones de Tripsina- Quimiotripsina - Peptidasa. Sin embargo estos métodos experimentales no fueron aceptados. La razón que se daba era la poca existencia de pruebas de evidencia sobre la correspondencia entre los valores mostrados y los obtenidos para *in vivo* y además porque los procedimientos eran complicados y consumían demasiado tiempo, lo que dificultaba su aplicación en rutinas de control de calidad en plantas.

Con todos estos estudios, **HSU y col., 1977**, encontraron que el pH de una suspensión de proteína después de 10 minutos de digestión con una solución fresca de multienzimas, (Tripsina, Quimiotripsina y Peptidasa), similar a la utilizada por RHINEHART, estaba altamente correlacionada con la aparente digestibilidad *in vivo* en pruebas sobre ratas. Afirmaron que los análisis de regresión de las 23 muestras ensayadas, mostraron que el coeficiente de correlación entre el pH a 10 minutos y la aparente digestibilidad *in vivo* fué 0.9 con un error estándar de estimación de 2.23.

HSU, y col., 1977, pudieron demostrar que el declinamiento del pH que ocurre lentamente en la solución enzimática recién preparada, se debe a la actividad de las enzimas proteolíticas adicionadas a la solución y a la inmediata liberación de los grupos carboxilo de los aminoácidos específicos que ataca cada enzima y que se hallan presentes en las proteínas de las muestras.

Se encontró por tanto que la ventaja más significativa de este método *in vitro* fué la predicción de la aparente digestibilidad de la proteína que puede ser completada en el término de una hora y con un alto grado de sensibilidad.

La enzima **Tripsina** hidroliza los aminoácidos polares por el **lado**

carboxilo de los residuos de Lisina, Arginina, generalmente se encuentran en la superficie de la molécula proteica e incrementan la solubilidad en agua; cuando se encuentran en el interior de la molécula, casi siempre forman puentes salinos.

Mientras que la **Pepsina** es específica para hidrolizar el lado **amino** del enlace peptídico en los aminoácidos Leucina, ácido Aspártico y Glutámico, Fenilalanina, Tirosina y Triptófano.

MATERIALES Y METODOS

1. SELECCION DE LAS MUESTRAS DE FRIJOL.

Las semillas seleccionadas para este estudio, se tomaron de la cosecha obtenida en la siembra del año 1996, en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria **CORPOICA, C.I.,1996**, Tibaitatá, localizado en el Municipio de Mosquera, Departamento de Cundinamarca, situado a 2600 metros sobre el nivel del mar, con temperatura promedio de 13 grados centígrados, precipitación anual promedio de 751 mm, distribuida en dos épocas lluviosas y dos secas, con suelos tipo franco arcillosos de fertilidad media, pertenecientes a la formación ecológica bosque seco montano bajo.

1. 1. Parentales:

La línea de frijol L-33341-M(2)-1, fué obtenida por el ICA usando el método de mejoramiento masal pedigrí, en el cual las generaciones tempranas F1 y F2 avanzaron masalmente, teniendo en cuenta sanidad, vigor, precocidad y calidad del grano. En siembras F3 se inició la fase de selección individual de plantas.

A partir de 1982 se incorporó a ensayos preliminares de rendimiento en las Estaciones de investigación del ICA. En el primer semestre de 1986 se inició la multiplicación con siembras en parcelas demostrativas, semicomerciales y con el establecimiento posterior de pruebas regionales en Boyacá y Nariño. Fué liberada comercialmente por el ICA a partir de 1994, con el nombre de Frijol **ICA CERINZA**.

Luego de los resultados obtenidos en clima templado con Maíz Opaco en 1965, en clima templado, con los híbridos ICA H 208 e ICA H 255, se iniciaron los cruzamientos en clima frío. La variedad de Maíz OPACO se obtuvo en el C.I. Tibaitatá, en 1970, por hibridación entre los maíces de clima frío y maíces portadores del gen Opaco-2.

Luego de muchas selecciones individuales por precocidad y características fenotípicas se lograron materiales genéticos promisorios. A partir del año 1975 se iniciaron pruebas regionales y semicomerciales para posteriormente liberar la variedad al mercado nacional en el año 1980, con el nombre de **Maíz OPACO ICA V 557**.

La clasificación taxonómica correspondiente a las plantas parentales utilizadas para obtener el frijol **experimental 2519** es la siguiente:

	FRIJOL	MAIZ
CLASE	DICOTILEDONEA	MONOCOTILEDONEA
ORDEN	ROSALES	GLUMIFLORALES
FAMILIA	LEGUMINOSAE	GRAMINAE
GENERO	Phaseolus	Zea
ESPECIE	<i>Phaseolus vulgaris</i> L	<i>Zea mays</i> LINNEO
CULTIVARIEDAD	ICA CERINZA	ICA V 557, OPACO

1. 1. 1. Semillas de Maíz Opaco:

De la cosecha de Maíz opaco del año 1996, sembrada en el lote 3 y en la parcela de multiplicación 96337, (proveniente del lote de selección 95205), del C.I. Tibaitatá CORPOICA, se tomaron 100 semillas de las mejores mazorcas recolectadas, (1 a 2 semillas por mazorca), se empacaron y rotularon.

1. 1. 2. Semillas de Fríjol ICA Cerinza:

De la cosecha de los frijoles, segundo semestre de 1996, del C.I. Tibaitatá, sembrados para el Experimento No. 2, (Bloques al Azar con 25 tratamientos, 4 repeticiones por tratamiento y 4 surcos de 5 mts X 0.60 mts por parcela), se tomaron 25 plantas de cada una de las parcelas de las repeticiones y de cada planta una semilla, (parcelas 96223, 96237, 96274 y 96291), luego se empacaron y rotularon.

1. 2. Semillas del Fríjol experimental 2519 F1:

La muestra experimental **2519 F1**, ver **Anexo No. 1**, proviene de los experimentos realizados en julio de 1994, en el invernadero de la Finca "San Javier", situada en la vereda el Mortiño, Municipio de Cogua, Departamento de Cundinamarca, propiedad de la Universidad Javeriana, situada a 2540 msnm, con temperatura promedio de 14°C. De la cosecha de 1994, empacada, rotulada y almacenada en bolsas de papel, que

contienen cada una las semillas por vaina y por planta, resultantes de la cosecha, se tomaron 100 bolsas al azar de igual número de plantas y de cada una se tomó 1 semilla, las cuales se reunieron y empacaron en una bolsa de papel que luego se rotuló.

1. 3. Semillas de Fríjoles experimentales 2519 F2 a F5:

De la cosecha de los fríjoles sembrados para el Experimento No. 2 del segundo semestre de 1996, del C.N.I.A Tibaitatá CORPOICA, se tomaron 25 semillas de igual número de plantas, de cada una de las 4 parcelas experimentales y para cada una de las progenies:

Semillas F2 : Parcelas 96209, 96228, 96258, 96292.

Semillas F3 : Parcelas 96210, 96250, 96271, 96279.

Semillas F4 : Parcelas 96211, 96240, 96266, 96288.

Semillas F5 : Parcelas 96212, 96235, 96253, 96284.

A continuación se empacan y rotulan en bolsas de papel, las 100 semillas de cada una de las progenies.

2. SELECCION DE LAS SEMILLAS

El procedimiento en general fue similar para las 7 clases de materiales seleccionados así:

- De cada grupo de 100 semillas se seleccionaron 50 en promedio, por similitud de características físicas: Color, brillo de la testa, forma del grano, sin presencia de plagas y enfermedades, semillas completas y de tamaño mediano a grande.
- Estas semillas seleccionadas se empacaron en bolsas de papel y se rotularon claramente.

3. OBTENCION DE LAS HARINAS

Las semillas de Fríjol se descascararon manualmente, y cada semilla se molió en un mortero de porcelana, hasta obtener harina fina, la cual se empacó en un tubo Eppendorf, de 1.5 ml, que se rotuló y selló.

En total se seleccionaron 180 muestras de harina de fríjol; 30 eran del fríjol ICA CERINZA y 150 de las progenies experimentales F1 a F5, con 30 muestras de cada una.

Para las 30 semillas seleccionadas de Maíz Opaco ICA V 557, se

procedió a moler cada semilla directamente en el mortero, luego de obtenida la harina de cada muestra, se empacó en un tubo Eppendorf debidamente rotulado.

4. EXTRACCION DE LAS PROTEINAS:

4. 1. Extracción de Proteína de harina de semillas de Fríjol:

De acuerdo al protocolo para extracción de proteínas de fríjol, **LAREO, 1993**, se prepararon 250 ml de un Buffer de extracción con Tris-HCl, 176 mM, pH 8.5 en solución salina al 1%, y se guardó en nevera.

Se pesaron 50 +/- 2 miligramos de cada una de las 180 muestras de harina de fríjol, en un tubo Eppendorf, previamente rotulado y a cada uno se le agregó 0.5 ml del buffer de Extracción.

Cada tubo se agitó por un minuto en un vortex, se dejó en nevera y reposo por media hora; cada media hora se volvió a agitar, y así por tres horas, luego se dejó en nevera. Al cabo de 12 y 24 horas se repitió el proceso. Luego se agitó nuevamente en el vortex por 1 minuto y se centrifugó a 4 °C (Centrífuga EPPENDORF Modelo 5410) y con velocidad máxima de rotación de 14000 RCF (Fuerza Centrífuga Rotativa), durante 15 minutos. El sobrenadante se separó en un tubo Eppendorf, de 1 ml, previamente rotulado y se llevó a congelación.

Al residuo sólido de cada una de las muestras de fríjol se le añadieron 0.25 ml de buffer de extracción y se repitió el proceso citado anteriormente por tres horas y se dejó en la nevera; a las 12, 24 y 36 horas se repitió el procedimiento.

Luego se agitó y centrifugó en las mismas condiciones del proceso anterior. El nuevo sobrenadante obtenido se mezcló con el primero y se llevó nuevamente a congelación.

4. 2. Extracción de Proteína de harina de semillas de Maíz:

Se pesaron 50 +/- 2 miligramos de cada una de las 30 muestras de harina, en un tubo Eppendorf, previamente rotulado. Se agregaron 0.5 ml del buffer de Extracción, se agitó en vortex por un minuto, se dejó en nevera y en reposo por media hora; cada media hora se volvió a agitar, y así por tres horas. Al cabo de 12 , 24 y 48 horas se repitió el proceso.

Luego se centrifugó a 4 °C y 14.000 RCF durante 25 minutos. Se separó

el sobrenadante y se llevó a congelación.

5. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA:

Se utilizó el método de lectura en UV con un rango de Absorbancia entre 280 y 260 nm para cuantificar las proteínas, **STOSCHECK, 1990**, el cual presenta una alta sensibilidad de lectura para un rango de concentración de proteína en la muestra entre 20 y 3000 ug.

Se calibró el equipo SPECTRONIC 2000, de acuerdo con su manual de operación, para lecturas en el rango de 280 a 260 nm. Se utilizó una cubeta para espectrofotómetro de material de cuarzo (SIGMA), con capacidad de 1 ml y 1 cm de paso de luz. El blanco utilizado fué 1 ml del Buffer de extracción.

Luego de realizar las actividades descritas en la parte correspondiente a metodología, para extraer la proteína de cada una de las 30 muestras de harina seleccionadas de Maíz Opaco, (denominado TM), frijol ICA Cerinza, (denominado TC), y de cada una de las progenies del frijol 2519, se procedió a determinar la concentración de la proteína de las muestras de harina, al UV a 280 y 260 nm, con el equipo SPECTRONIC 2000 previamente estandarizado.

De cada extracto se tomaron 50 microlitros y se llevaron a 1 mililitro con el buffer de extracción, se llenó la celda de cuarzo de 1 cm de ancho y se anotaron las lecturas a 280 nm y a 260 nm.

Aplicando la fórmula citada por **STOSCHECK, 1990**, se calculó la concentración de las proteínas presentes en la muestra utilizada, en mg por cada ml., así:

$$\text{Concentración de la proteína (mg/ml)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}.$$

Conocida la concentración de cada una de las muestras y el factor de dilución se pudo determinar el porcentaje de proteína presente en cada muestra de harina, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \text{concentración} \times \text{factor de dilución de la muestra}$$

6. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO:

Se realizó una curva de calibración con Albúmina de Suero Bovino al UV,

en un gradiente de diluciones para observar el funcionamiento del buffer de extracción. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada una de las muestras de proteína obtenidas con el protocolo anteriormente mencionado y se leyeron al UV.

Los cálculos de porcentaje de proteína realizados con los datos obtenidos se compararon con los valores reportados en la literatura y se observó que eran demasiado bajos. Se procedió a realizar algunos ajustes en los volúmenes del Buffer de extracción con el fin de obtener una adecuada extracción de las proteínas de las muestras.

Se repitió el procedimiento en varias oportunidades hasta que por fin se pudo lograr obtener concentraciones de proteína que fueran leídas por el UV y mostraran datos de porcentaje de proteína en las muestras similares a los reportados en la literatura.

7. ELECTROFORESIS.

Para realizar las electroforesis en geles de Poliacrilamida se tuvo en cuenta:

- La proteína y el pretratamiento de la muestra.
- La preparación de los reactivos para la elaboración del gel.
- Estandarización del protocolo para la corrida de la muestra, de acuerdo al tipo de electroforesis a realizar: Nativa, sin SDS ni Mercaptoetanol y Desnaturalizada, con SDS y Mercaptoetanol.

7. 1. Preparación de los reactivos:

Se prepararon los diferentes stocks de soluciones con reactivos BIO - RAD, para las electroforesis en geles de poliacrilamida con proteínas nativas y desnaturalizadas SDS-PAGE teniendo en cuenta el procedimiento que acompaña el Manual para la cámara vertical de electroforesis MINIPROTEAM II de **BIO-RAD, 1997**, que utiliza el protocolo de LAEMMLI, 1970, y que se presenta en el **ANEXO No. 2**.

Los stocks de reactivos utilizados para correr las proteínas nativas se diferencian de los de SDS-PAGE en que no utilizan SDS ni Mercaptoetanol. Para la extracción de proteínas de semillas de maíz, Protocolo de maíz de **LANDRY y MOUREAUX, 1970**, se preparó el siguiente stock de reactivos:

- 50 ml de Agua desionizada (se mantuvo refrigerada).
- 50 ml de NaCl 0.5 M (se mantuvo a 4 °C.)

- 50 ml de Isopropanol al 70 %, (se dejó a temperatura del laboratorio).

7. 2. Extracción de proteínas con protocolo para frijol, CIAT:

Para todas las muestras de harina de parentales y progenies de frijol 2519, las proteínas fueron extraídas usando el protocolo que utilizó el buffer Tris-HCl, 176 mM, pH 8.5 en solución salina al 1%, en la forma en que se describió anteriormente, en la parte correspondiente a extracción de proteínas.

7. 3. Extracción de proteínas con protocolo para Maíz:

En este caso y para todas las muestras de harinas de los materiales objeto de estudio, se utilizó el método de fraccionamiento desarrollado por **LANDRY y MOUREAUX, 1970**, modificado para nuestras condiciones así:

Se pesaron en un tubo Eppendorf, 50 +/- 0.1 mg de harina de cada una de las muestras a estudiar: A cada muestra se le agregaron 0.2 ml de NaCl 0.5M (4°C), la mezcla se agita por 1 minuto en vortex, luego se sonica por espacio de 1 hora en baño con hielo; luego se agita por 1 minuto en vortex cada media hora y por tres horas, luego se deja en reposo en nevera.

A las 12, 24 y 48 horas se repite el procedimiento, al cabo de las cuales se agita por un minuto en vortex y se centrifuga por 15 minutos a 14.000 RCF, se extrae el sobrenadante, se rotula y se lleva a congelación.

El precipitado se mezcla con 0.2 ml de agua destilada y desionizada y agita en el vortex por 1 minuto, cada media hora y por tres horas, luego se deja en reposo en nevera. A las 12, 24 y 48 horas se repitió el procedimiento, al cabo de las cuales se agita en vortex por 1 minuto y se centrifuga a 14.000 RCF por 25 minutos, se extrajo el sobrenadante, se marcó bien y se llevó a congelación.

El precipitado se mezcló con 0.2 ml de Isopropanol del 70% y se agitó en el vortex por 1 minuto, cada media hora y por tres horas, luego se dejó en nevera. A las 12, 24 y 48 horas se repitió el procedimiento, al cabo de las cuales se agitó en vortex por 1 minuto y se centrifugó por 25 minutos a 14.000 RCF, se extrajo el sobrenadante, se rotuló y se llevó a congelación.

7. 4. Estandarización del protocolo para electroforesis:

De cada una de las muestras de proteína de Frijol y Maíz, se colocaron 50 ul en un tubo Eppendorf de 0.5 ml de capacidad y se mezcló con diferentes volúmenes de buffer reductor, para encontrar la dilución que

mostrara la mejor resolución de las bandas de proteína en el gel y luego se llevaron a congelación. Para el caso de electroforesis SDS-PAGE se deben desnaturalizar las muestras de proteína en agua hirviendo a 95 °C por 5 minutos

Para analizar las diferentes fracciones que se pueden extraer de las harinas de semillas de los parentales se ensayaron dos procedimientos, cada uno de los cuales es específico para cada parental, el del **CIAT, 1992**, para fríjol y el de **LANDRY y MOUREAUX, 1970**, para maíz, como se discutió anteriormente.

7. 4. 1. Electroforesis para proteínas nativas, extraídas con protocolos para fríjol CIAT y para Maíz LANDRY y MOUREAUX

De cada una de las muestras de proteína de Fríjol y Maíz extraídas, se

TABLA No. 1 Estandarización de los valores correspondientes a las muestras objeto de estudio (maíz opaco, fríjol ICA Cerinza y progenies del fríjol experimental 2519), teniendo en cuenta los protocolos de extracción, el tipo de gel, la concentración de las muestras de proteína, el voltaje de corrida de cada gel y el volumen de la muestra a ser colocada en cada pozo.

PROTOCOLO EXTRACCION	GELES	DILUCION MUESTRAS	VOLTAJE Y AMPERAJE	VOLUMEN SIEMBRA
PROTOCOLO CIAT	10-12 %	FRIJOLES : 1: 3 a 1: 9 MAIZ : 3: 1 a 1: 2	150 - 60 V 150 - 40 mA	3.5 – 20 uL 10 – 25 uL
ESTANDARIZACION	12 %	MAIZ, TM : 2: 1 CERINZA, TC 1: 4 PROGENIES 1: 5	150 V 100 mA.	20 uL 5 uL 3.5 uL
PROTOCOLO MAIZ	7.5-13.5 %	FRIJOLES: 1: 3 a 1: 9 MAIZ : 3: 1 a 1: 2	150 - 60 V 150 - 40 mA	3.5 – 20 uL 10 – 25 uL
ESTANDARIZACION	12 %	MAIZ, TM : 2: 1 CERINZA, TC 1: 4 PROGENIES 1: 5	100 V 85 mA.	10 uL 5 uL 3.5 uL

tomó una alícuota que se mezcló con el correspondiente volumen del buffer reductor, para encontrar la proporción de la dilución que mostrara la mejor resolución de las bandas de proteína en el gel. Los geles de **almacenamiento** siempre fueron del 4% (Acrilamida / Bis Acrilamida).

7. 4. 2. Electroforesis con proteínas desnaturalizadas SDS-PAGE extraídas con protocolos para frijol CIAT,1992 y para Maíz LANDRY y MOUREAUX, 1970.

En la **TABLA No. 2**, se observan los valores experimentados usados y la respectiva estandarización para los geles de **separación**, con proteínas desnaturalizadas SDS-PAGE de las muestras de frijol y maíz.

TABLA No. 2 Valores utilizados para la estandarización de los protocolos para los geles con proteínas desnaturalizadas de las muestras de Maíz y Frijoles.

EXTRACCION	GELES	DILUCION MUESTRAS	VOLTAJE AMPERAJE	VOLUMEN SIEMBRA
PROTOCOLO CIAT	7.5-15 %	FRIJOL : 1: 3 a 1: 9	200 V 150 mA	2.5-20 uL
		MAIZ : 3: 1 a 1: 2		10 – 20 uL
ESTANDARIZACION	12 %	MAIZ, TM : 2 : 1	150 V 100 m mA	20 uL
		CERINZA, TC 1 : 4		5 uL
		PROGENIES 1 : 5		3.5 uL
PROTOCOLO MAIZ	7.5-15 %	FRIJOL : 1: 3 a 1: 9	200 - 75 V 150- 75 mA	2.5- 10 uL
		MAIZ : 3: 1 a 1: 2		5 - 20 uL
ESTANDARIZACION	12 %	MAIZ, TM : 2 : 1	100 V 75 mA	7.5 uL
		CERINZA, TC 1 : 4		3.5 uL
		PROGENIES 1 : 5		2.5 uL

De cada una de las muestras de proteína de Frijol y Maíz, extraídas con los dos protocolos anteriormente mencionados, se tomó una alícuota de las muestras de frijol y de maíz. Se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.5 ml de capacidad que se mezcló con el correspondiente volumen de buffer reductor (con SDS y Mercaptoetanol), para encontrar la proporción de la dilución que mostrara la mejor resolución de las bandas de proteína en el gel.

Posteriormente se desnaturalizaron las muestras de proteína, preparadas en agua hirviendo a 95°C por 5 minutos y luego se llevaron a congelación.

Los geles de **almacenamiento** siempre fueron del 4% (Acrilamida / Bis

Acrilamida), de acuerdo con el manual de la cámara de electroforesis.

Se corrieron geles de SDS-PAGE, según las condiciones estandarizadas previamente, de acuerdo a un plano de siembra para cada gel, (que correspondió siempre a 7 muestras diferentes y una muestra denominada Patrón de Proteína de peso molecular conocido, SIGMA), de la siguiente forma:

- 4 geles para muestras del frijol ICA CERINZA, denominadas **TC**.
- 4 geles para muestras del maíz OPACO, denominadas **TM**.
- 2 geles para cada una de las 5 progenies del frijol experimental 2519, con siete muestras, y el respectivo marcador de peso molecular conocido, **F1, F2, F3, F4, y F5**.
- 6 geles con siete muestras cada uno, en los cuales se combinaron al azar los 7 materiales objeto de estudio.
- 4 geles en los cuales se combinan las muestras de proteínas extraídas con los dos protocolos.

7. 5. Movilidad relativa

La lectura de la longitud promedio de corrida de los geles con las muestras de proteína se realizó con la regla que forma parte del kit de la cámara de electroforesis Miniproteam II de BIO-RAD. De igual forma se procedió a leer las posiciones de todas las bandas de cada muestra de proteína en el gel, los cuales se numeraron de 1 a 16, en el orden en que las diferentes muestras fueron corridas.

Con el fin de poder comparar adecuadamente estas lecturas en los 20 geles se procedió a calcular la movilidad relativa, que corresponde a la relación existente entre la posición de la banda de proteína en el gel y la longitud total de corrida de las muestras en el gel.

Se calculó el logaritmo en base 10, del Peso Molecular de cada banda de proteína, usada como proteína marcadora, de la empresa comercial SIGMA. Con este valor y el de la movilidad relativa corregida se obtuvo, mediante el uso del programa computacional EXCEL una gráfica de la dispersión de los datos; con la mejor línea recta que corresponde a estos datos y su coeficiente de correlación R^2 , que en todos los casos fué mayor a 0.9.

7. 6. Perfil electroforético:

Con el objeto de poder establecer un patrón general que permitiera la identificación de las bandas, se determinó para cada tipo de muestra el promedio y la desviación estándar de las movilidades relativas de las

bandas que se encontraron a distancias menores de 0.6 cm, considerando que toda banda que cayera dentro de este rango corresponde a la misma proteína.

Con estos valores se va realizando el perfil electroforético, situando en el eje **Y** las Movilidades Relativas y en el eje **X** las muestras del material experimental a comparar.

7.7. Análisis Densitométrico.

El procedimiento consiste básicamente en utilizar un equipo de video conectado a un computador que posee un programa que permite capturar la imagen del gel. A continuación y mediante el uso del programa **AAB** (American Applied Biotechnology, de Universal Software for Windows), se analizan cada una de las muestras a estudiar en el gel y entrega como resultado una gráfica en la cual se reporta la **similitud** entre las diferentes muestras y los valores correspondientes a su posición, altura del pico (densidad óptica), área, y porcentaje de área de la banda.

Para el cálculo de la similitud, según **CRISCI, 1983**, el programa elabora matrices que relacionan la distancia entre cada banda, su ancho, la intensidad óptica, y el número total de bandas en la muestra. En cada gel, éste procedimiento genera una **gráfica patrón** para cada muestra y posteriormente las relaciona entre sí, mostrando a continuación y de manera ordenada los valores, en porcentaje, de las similitudes encontradas para las diferentes muestras de proteínas.

8. DIGESTIBILIDAD "In vitro

El procedimiento general para determinar la digestibilidad in vitro de una muestra de harina consiste en determinar el pH al cabo de 10 minutos, para proteínas puras y harinas con alto porcentaje de proteína, cuando la muestra es sometida a la acción de una enzima proteolítica. Con estos valores y los reportados en la literatura para digestibilidad **in vivo**, se elabora una curva de calibración y se calcula la respectiva ecuación de la curva, para cada enzima. Posteriormente se calculan los pH de las soluciones de las muestras de harina al ser tratada por 10 minutos con la enzima. Con los valores obtenidos para cada muestra se calcula su digestibilidad.

Las enzimas utilizadas en este experimento, según el procedimiento, **HSU, 1977**, fueron TRIPSINA pancreática porcina SIGMA con 14.19 U. E. por mg de proteína y PEPSINA de mucosa estomacal porcina SIGMA con actividad de 3200-4000 unidades por mg de proteína.

Como proteínas puras se usaron Suero Bovino SIGMA, (fracción V) del 98-99 % de Proteína, Caseína pura (SIGMA), Harina de Soya, tipo comercial (RICA SOYA) con 48 % de proteína ; Proteína Vegetal, tipo comercial, (CARVE), con 50% de proteína de soya. y FASEOLINA, tipo B, proteína liofilizada de frijol, suministrada por LAREO y obtenida en el CIAT.

Según el procedimiento, la cantidad de harina de cada muestra a usar depende de su porcentaje de proteína en tal cantidad que sea equivalente a una concentración de 6.25 mg/ml. , **HSU, 1977.**

A 10 mililitros, recién preparados, de suspensión acuosa de cada muestra de harina, le fué ajustado el pH a 8.0 con HCl 0.1 N y/o NaOH, 0.1 N, con agitación continua, mientras se mantenía a 37°C en baño María. A la solución recién preparada de enzima que contenía 1.6 mg/ ml de Tripsina y/o 1.3 mg/ ml de Pepsina, le fué ajustado su pH a 8.0 con NaOH y mantenida en baño con hielo a 4 - 5 °C. Un mililitro de la solución de enzima o de multienzimas (Tripsina + Pepsina), se añadió a los 10 ml de la suspensión de harina recién preparada, que se mantenía a 37°C. El declinamiento del pH ocurrió lentamente. El pH fué medido minuto a minuto y el valor encontrado a los 10 minutos se tomó para realizar los cálculos de digestibilidad. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

Con los valores de pH obtenidos para proteínas puras, se elaboraron las respectivas curvas de calibración para cada enzima, tomando como valor en el eje **X** el correspondiente al pH a los 10 minutos y en el eje **Y** el valor correspondiente a la digestibilidad *in vivo* reportado, **HSU, 1977.** Se determinaron las líneas rectas y con las ecuaciones obtenidas se calculó la digestibilidad *in vitro* de las muestras obtenida en cada caso, de tal forma que la variable independiente **X** corresponde al pH obtenido a los 10 minutos y la variable dependiente **Y** corresponde a la digestibilidad en la ecuación de la curva de calibración.

ANALISIS DE RESULTADOS

1. CUANTIFICACION DE PROTEINAS:

Las variaciones en los datos se corrigieron de acuerdo al procedimiento estadístico de CHAUVENET, que permite descartar los valores que se encuentran por encima o por debajo del promedio con mas o menos una desviación estándar. Esos valores descartados no fueron tenidos en cuenta para ninguno de los cálculos estadísticos posteriores y el resumen de los datos obtenidos aparece en la **TABLA No. 3**

TABLA No. 3 Resumen de los valores promedios, desviación estándar, coeficiente de variación y los valores máximos y mínimos del porcentaje de proteína de los parentales y progenies del frijol experimental 2519.

VAR ESTUD.	PARENTALES		PROGENIES DEL FRIJOL 2519					
	MAIZ	FRIJOL	F1	F2	F3	F4	F5	PROM
PROM	8.56	17.90	21.23	22.57	21.98	22.41	22.05	22.02
DEST	0.98	1.69	1.57	1.45	1.23	2.25	2.19	1.74
CVAR	11.51	9.46	7.41	6.40	5.61	10.02	9.95	7.88
MAX	10.34	21.16	23.99	25.27	24.89	26.00	24.96	26.00
MIN	6.83	15.39	18.63	20.39	20.37	19.32	18.29	18.29
“ t “ .01			**	**	**	**	**	**
PROB			P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

** Diferencias altamente significativas entre progenies del frijol 2519 y el frijol ICA Cerinza. La Probabilidad fue también en todos los casos menor que el nivel de Significancia.

En el Maíz Opaco, ICA V 557, con 22 valores depurados del porcentaje de proteína, (**ver Anexo No. 4**), se encontró un máximo de 10.34% y un mínimo de 6.83%, con un promedio de 8.56 +/- 1%, con un coeficiente de variación de 11.51

Para el frijol ICA CERINZA, en los 21 valores depurados de la proteína,

se encontró un máximo de 21.16 % y un mínimo de 15.39 %. El promedio fue 17.9 +/- 1.69 % con un coeficiente de variación de 9.46.

Obsérvese que los valores máximo y mínimo de proteína en frijol ICA CERINZA fueron 21.16% y 15.4 %. Estos valores se pueden comparar con los valores máximos y mínimos de las progenies F1 a F5 que fueron 26.0% y 18.29%.

Si comparamos estas cifras encontramos, que el valor mínimo de las proteínas de las progenies del frijol **2519** es mayor que el valor promedio del frijol ICA CERINZA. (17.9%).

En los cinco casos en que se compara cada progenie experimental con el frijol ICA CERINZA, se observa que los valores para el **estadístico t son mayores** que el **valor crítico para "t"** y de manera similar en el **análisis de varianza, el Fc es menor que el F** de las tablas, ambos análisis con nivel de significancia del 0.01. Esto nos indica que la diferencia en los valores del porcentaje de proteína entre las progenies experimentales 2519 y el frijol ICA CERINZA es altamente significativa, ver **Anexos No. 5 y 6**.

2. ELECTROFORESIS:

Para tratar de dilucidar el posible origen del incremento del porcentaje de proteína en las muestras del frijol **2519**, se procedió a realizar pruebas electroforéticas en poliacrilamida utilizando dos protocolos diferentes de extracción de proteínas, específicos para cada parental, e incluyendo en cada uno las muestras correspondientes a las progenies con el fin de estar seguros de que todas las proteínas fueran extraídas.

2. 1. Electroforesis de proteínas nativas extraídas con protocolo para frijol, tipo CIAT.

Con el protocolo de extracción de proteínas para frijol, se extrajo la proteína de las muestras de parentales y progenies del frijol **2519**, y posteriormente se corrieron en geles de poliacrilamida del 10% en condiciones no denaturantes. Luego del proceso de la electroforesis, se analizaron los geles y se observaron grupos definidos de proteínas.

En los análisis por densitometría de estos geles se encontró que la similitud entre las muestras del maíz Opaco, TM, es baja; entre las progenies del frijol **2519** es mayor del 81%; se comparó el frijol ICA Cerinza y las progenies del frijol **2519** y se encontró que la similitud es mayor del 82%.

2. 2. . Electroforesis de proteínas nativas extraídas con protocolo para Maíz tipo LANDRY y MOUREAUX.

En los geles de Poliacrilamida del 12%, correspondientes a las diferentes muestras de proteínas de parentales y Progenies del frijol **2519**, se nota buena separación entre las bandas en las extracciones con sal S y con agua A.

En la **TABLA No. 4**, se puede analizar que la extracción de proteínas es diferente para cada uno de los procesos, en todos los casos de extracción con agua A, vemos mayor cantidad de bandas de proteínas que en el caso de extracción con sal S; también observamos que el maíz presenta proteínas de medio y bajo peso molecular mientras que para las muestras de proteínas del frijol ICA Cerinza y progenies del frijol 2519, se observa el predominio de las bandas de proteínas de alto, medio y bajo peso molecular.

TABLA No. 4 Comparación de los promedios de porcentajes de similitud de las bandas de proteína extraídas con sal S y con agua A, en los materiales Maíz Opaco TM, frijol Cerinza TC, y progenies F2 y F4, del frijol experimental 2519 (**). Electroforesis nativas en geles de poliacrilamida del 12%, con proteínas extraídas con el protocolo para maíz.

	TMS	TMA	TCS	TCA	F2S	F2A	F4S
TMA	71.6						
TCS	0.0	19.2					
TCA	12.6	43.4	80.1				
F2S	0.0	29.1	94.0	84.7			
F2A	13.1	45.7	81.0	92.1	90.5		
F4S	0.0	24.0	96.2	82.9	97.0	87.4	
F4A	5.5	44.3	78.0	88.8	84.4	96.1	84.8

** . Datos obtenidos por densitometría.

Se muestran los valores promedios correspondientes a los porcentajes de similitud en las diferentes combinaciones de las muestras de proteína que se corrieron en los geles nativos del 12%, en las extracciones con sal S y con agua A, para los parentales y algunas progenies del frijol **2519**.

En general se observa que los porcentajes de las similitudes de las extracciones con sal S, presentan menor similitud que las extracciones con agua.

Se encontró que los valores de las similitudes fueron mayores para las proteínas de maíz extraídas con agua A, frente a las de maíz extraídas

con el protocolo CIAT y también mayores que para las del maíz extraído con sal.

También se analizaron y compararon geles con muestras de proteínas de maíz, frijol y progenies extraídas con el protocolo para frijol y muestras de maíz extraídas con el protocolo para maíz.

2. 3. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas extraídas con protocolo para frijol, tipo CIAT.

De las muestras de proteína obtenidas con el protocolo CIAT, se tomaron al azar 7 muestras por cada material de estudio y se procedió a efectuar varias electroforesis con geles SDS-PAGE del 12%.

Siguiendo la metodología que aparece en la sección correspondiente, en cada gel SDS-PAGE, para las proteínas de peso molecular conocido, usadas como marcador, se tomaron las lecturas correspondientes a las posiciones reales de cada banda de proteína, que corresponde a los cm efectivamente corridos por dicha banda, desde el inicio del gel.

Para cada uno de los 20 geles seleccionados, se comparó la posición original (**Pos**), corregida (**Posc**) y movilidad relativa (**Mr**) de cada una de las bandas de las proteínas de peso molecular conocido, utilizados como marcadores. En aquellos casos en que estas bandas coincidieron completamente, ver **Anexo No. 7**, se observa que para los geles 1 y 7; 4, 5, 10 y 16 los datos se presentan en forma conjunta.

De igual forma, para las proteínas usadas como marcadores de peso molecular, se relacionó por medio de un gráfico, el logaritmo del peso molecular en base 10, de cada banda y su correspondiente movilidad relativa. Mediante el uso del sistema computacional EXCEL, se realizó el cálculo y ajuste de la línea recta y su correspondiente ecuación. Se pueden observar los valores de la ecuación obtenidos en todos los geles y su correspondiente coeficiente de correlación, R^2 , cercano a la unidad.

Posteriormente, para cada uno de los geles estudiados se organizaron tablas en las cuales se relacionan los valores correspondientes a la posición de la banda corregida (**Posc**) y con la longitud de corrida de cada gel se calcularon las respectivas movilidades relativas (**Mr**).

Para efectos de comparaciones se establecieron Rangos de Movilidad relativa, de tal manera que cada rango (0.10 unidades) equivale aproximadamente a 0.6 cm de gel; de igual forma al agrupar estas movilidades relativas se calculó la correspondiente desviación estándar.

Finalmente se encontraron 99 bandas correspondientes a las muestras de

proteína del maíz Opaco **TM**, 186 bandas de proteína para el frijol Cerinza **TC** y en las bandas de proteínas de las progenies del frijol **2519** se observaron 113 bandas para F1, 117 bandas para F2, 114 bandas para F3, 133 bandas para F4 y 128 bandas para F5. **TABLA No. 5.**

Se observó para el parental maíz **TM** que hay mayor presencia de proteínas en el rango de movilidad relativas **0.50 a 0.99**, que equivalen a un 92% del total de proteínas, mientras que el parental frijol Cerinza **TC** muestra un 61% de proteínas y el promedio de las progenies 55%.

En el rango de **0.30 a 0.49** el parental maíz Opaco **TM**, presenta 6% de las bandas y el Frijol Cerinza **TC**, presenta 26%, mientras que las progenies **2519**, muestran un 28%.de las bandas de proteína.

En el rango de movilidad relativa **0.0 a 0.29**, con pesos moleculares entre 70 y 90 kDa, el Maíz Opaco presenta un 2% de bandas, el frijol Cerinza **TC** un13% y el promedio de las progenies **2519** muestra un 17%.

TABLA No. 5. Número de bandas de proteína en los geles SDS-PAGE del 12%, acumuladas en los geles analizados. TC y TM parentales. F1 a F5 progenies del frijol experimental 2519.

RANG O	TC	TM	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
0.1-0.19	7	0	5	4	5	5	5
0.2-0.29	17	2	15	16	15	17	18
0.3-0.39	24	2	17	16	15	18	17
0.4-0.49	24	4	15	16	17	18	19
0.5-0.59	18	12	12	11	11	13	14
0.6-0.69	12	15	8	9	10	11	10
0.7-0.79	28	18	16	16	13	17	16
0.8-0.89	24	18	13	15	15	18	15
0.9-1.0	32	28	12	14	13	16	14
TOTAL	186	99	113	117	114	133	128

Con el interés de estudiarlas se tomó como dato base del cálculo, el número total de las bandas correspondientes al frijol Cerinza y proporcionalmente se obtuvo el número de bandas para el resto de materiales y posteriormente se buscó el promedio para las 5 progenies. A

continuación se calculó el porcentaje de bandas de proteínas que se situaron dentro de cada rango de movilidad relativa **TABLA No. 6.**

TABLA No. 6. Comparación de número de bandas en los geles SDS-PAGE del 12% por sus rangos de movilidad relativa. Protocolo de extracción de proteínas tipo frijol.

RANGO	PESO	FRIJOL	CERINZA	MAIZ	OPACO	FRIJOL	2519
M. REL	MOL	# BAND	% BAND	# BAND	%BAND	#BAND	%BAND
0.1-.19	90	7	3.8	0	0	7	3.2
0.2-.29	80	17	9.1	4	2.1	25	13.4
0.3-.39	66	24	12.9	4	2.1	26	14.0
0.4-.49	45	24	12.9	8	4.0	26	13.8
0.5-.59	36	18	9.7	22	12.1	19	10.0
0.6-.69	29	12	6.5	28	15.0	15	7.9
0.7-.79	24	28	15.1	34	18.2	24	11.7
0.8-.89	20	24	12.9	34	18.2	23	12.4
0.9-.99	14	32	17.2	52	28.3	23	12.0

**M.REL, movilidad relativa; PESO MOLECULAR, dado en KDa, de acuerdo a la comparación con los estándares de peso molecular SDS7 de SIGMA; # BAND, es el número de bandas promedio de cada muestra en ese rango de movilidad relativa; %BANDAS, porcentaje total de bandas de proteína con similar movilidad relativa y con la menor desviación estándar. Maíz opaco TM, frijol Cerinza TC y promedios de progenies de frijol 2519.

Analizando por un método óptico (densitometría) la similitud entre las líneas de corrida de las muestras y sus bandas de proteína, en los diferentes geles y comparando la similitud entre todas las muestras estudiadas se observan variaciones, que se agruparon en rangos de similitud, **TABLA No. 7.**

En los diferentes geles de maíz TM, se observaron similitudes mayores del 89 %, lo que nos indica poca variabilidad en las proteínas extraídas de las diferentes muestras.

En las muestras de frijol Cerinza TC se observan los valores de similitud entre los diferentes geles, que oscilaron entre el 25 y 97%, lo que nos indica alta variabilidad entre las semillas de frijol Cerinza, utilizadas para extraer la proteína.

Por este motivo se procedió a utilizar para la mayoría de los geles las muestras que presentaron similitudes superiores al 80%. Al comparar la similitud del Frijol y del maíz se observa que es del 0%. y al comparar el parental ICA Cerinza, TC con las progenies se observa que la similitud es mayor al 73 %,

TABLA No. 7. Comparación de los rangos de similitudes entre los diferentes geles SDS-PAGE del 12%, con proteínas extraídas con protocolo fríjol.

	TM	TC	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
TM	72-96						
TC	12	25-97					
F 1	13	61-94	88-97				
F 2	9	68-93	89-99	85-95			
F 3	15	61-86	79-94	81-96	86-94		
F 4	18	65-91	82-94	86-95	87-99	86-95	
F 5	7	64-89	79-95	85-96	87-98	87-99	85-95

(*) Parentales maíz opaco TM; fríjol ICA Cerinza TC; progenies F1 a F5 del material experimental 2519.

Contrastando con lo anterior, en las muestras de las progenies del fríjol 2519 se observan similitudes altas: F1 entre 88-97 %, en la F2 varía entre 85-95 %, en la F3 varía entre 86 y 94 %, en la F4 varía entre 86 y 95 %, en la F5 varía entre 85 y 95 %.

Observando la similitud entre las diferentes muestras de las progenies del fríjol 2519, se encuentra que ésta es mayor del 94%.

2. 4. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas extraídas con protocolo para Maíz tipo LANDRY y MOUREAUX.

Para los geles SDS-PAGE, se realizaron diversas combinaciones de las muestras de Proteínas, y del tipo de extracción realizada. Se puede observar que las extracciones con agua A y con sal S, presentan buena separación, en geles del 12%.

En la **TABLA No. 8**, se pueden observar los diferentes rangos de similitud obtenidas en la comparación por densitometría de las bandas de proteína extraídas con sal y con agua. Para el maíz TM se encontraron variaciones entre 15 y 62%.

Al comparar los parentales Cerinza TC y maíz Opaco TM se observa que la similitud varía entre 0 y 65% y que la definición de las bandas en estos geles es bastante alta.

De igual forma se observan las comparaciones entre las extracciones con

sal del frijol Cerinza TCS, y con agua TCA, y las progenies del frijol 2519. Se observa que las separaciones para las bandas de las diferentes muestras fué mejor con extracciones de agua.

TABLA 8. Comparación de los rangos de similitudes entre los diferentes geles SDS-PAGE, del 12%, con proteínas extraídas con protocolo Maíz. Extracción con agua A, con sal S. TM maíz Opaco; TC frijol ICA Cerinza; F2 y F4 son progenies del frijol 2519.

	TMA	TMS	TCA	TCS	F2A	F2S	F4A
TMA	53-75						
TMS	15-62	26-75					
TCA	3-58	10-62	-				
TCS	-	9-15	-	-			
F2A	8-18	29-50	65-81	-	-		
F2S	-	11	-	82	-		
F4A	6-12	24-48	35-62	-	84-89	-	
F4S	-	13-48	-	70-78	-	93	-

(*) Extracción con agua A; Extracción con sal S; TM es Maíz Opaco, TC es frijol ICA Cerinza, F2 y F4 son progenies del frijol 2519.

En el caso de la extracción con sal, TC la comparación de la similitud con las progenies del frijol 2519 estuvo entre 70 y 82 %. La similitud encontrada para las muestras TC extraídas con agua varió entre 35-81 %, sin embargo la similitud entre las progenies con agua y con sal fueron del 84 al 93%.

3. DIGESTIBILIDAD “ in vitro”.

Los resultados anteriores muestran variaciones amplias en la concentración de las proteínas en las progenies del frijol 2519, frente al parental frijol ICA CERINZA, en algunas bandas de Proteínas bien definidas.

Sin embargo una mayor concentración de proteína no asegura su utilidad en la nutrición, a no ser que esta proteína sea suficientemente digerible, por lo tanto, con el objeto de asegurar si la proteína de la progenie es

diferente o igual a la del parental se procedió a realizar una prueba de digestibilidad *in vitro* de estas proteínas, partiendo de harinas crudas de los materiales objeto de estudio y siguiendo un protocolo que se puede comparar con una digestión *in vivo*.

Con las lecturas de pH al cabo de 10 minutos de la digestión con **Pepsina**, para proteínas puras, se elaboró la curva de calibración de la digestión, en la cual se relaciona el pH y su porcentaje de digestibilidad "*in vivo*", la cual presentó la ecuación de la línea recta

$$Y = - 27.562X + 299.76$$

con coeficiente de correlación $R^2 = 0.9292$.

Con esta ecuación se calculó el porcentaje de digestibilidad "*in vitro*" de la **Pepsina** sobre las muestras a investigar **TABLA No. 9**. Se observa que el mayor porcentaje de digestibilidad de la enzima fue obtenido por el maíz OPACO y que el promedio para el CERINZA fue inferior a los valores mostrados por las Progenies 2519.

TABLA No. 9. Valores promedios de la digestión con enzimas digestivas Tripsina, Pepsina y la Mezcla de las dos, sobre muestras de harina de Maíz Opaco TM, Frijol ICA Cerinza TC y progenies del Frijol 2519, F1 a F5

	TM	TC	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
% PROTEÍNA	8.83	17.90	21.16	22.92	22.68	21.67	21.56
PEPSINA							
pH 10 min.	7.65	7.91	7.89	7.90	7.89	7.90	7.90
DIG PROM	89.05	81.84	82.20	82.02	82.20	82.11	81.93
DESVEST	0.19	0.16	0.16	0.28	0.32	0.42	0.16
% PROT DIG	7.86	14.65	17.39	18.80	18.64	17.79	17.66
TRIPSINA							
pH 10 min.	7.64	7.93	7.92	7.91	7.91	7.92	7.91
DIG PROM	91.06	85.44	85.69	85.82	85.82	85.69	85.82
DESVEST	0.13	0.19	0.11	0.19	0.19	0.11	0.19
% PROT DIG	8.04	15.29	18.13	19.67	19.46	18.57	18.50
TRIPSINA – PEPSINA							
pH 10 min.	7.52	7.85	7.81	7.80	7.80	7.80	7.80
DIG PROM	91.68	86.09	86.58	86.66	86.70	86.74	86.74
DESVEST	0.09	0.12	0.12	0.07	0.12	0.07	0.07
% PROT DIG	7.96	15.41	18.32	19.86	19.66	18.80	18.70

Con las lecturas de pH al cabo de 10 minutos de la digestión con

Tripsina, para proteínas puras, se elaboró la curva de calibración de la digestión y se calculó la ecuación de la línea recta

$Y = -19.053 X + 236.53$ por el maíz OPACO y que la
con coeficiente de correlación $R^2 = 0.9083$.

Se calculó el porcentaje de digestibilidad “ *in vitro* ” de la **Tripsina** sobre las muestras a investigar. En la **TABLA No. 9** se observa que el mayor porcentaje de digestibilidad fue obtenido digestibilidad del CERINZA fue menor que la de las progenies del frijol 2519.

Con las lecturas de pH obtenidas para la digestión de las muestras de proteínas puras con la mezcla de las enzimas **Tripsina y Pepsina**, se elaboró la curva de calibración, en la cual se calculó la ecuación de la línea recta

$$Y = -12.206 X + 181$$

con coeficiente de correlación $R^2=0.9303$.

Con esta ecuación se calculó el porcentaje de digestibilidad “ *in vitro* ” de la mezcla de las enzimas sobre las muestras a investigar y sus resultados aparecen en la **TABLA No. 9**. Se observa que el mayor porcentaje de digestibilidad fue obtenido sobre el parental Maíz Opaco, con un promedio de 91.68 % y que la digestibilidad del Fríjol ICA CERINZA fue ligeramente inferior al promedio calculado para las progenies del frijol 2519. También se muestra un resumen promedio de las lecturas obtenidas para la mezcla de enzimas y los resultados se ven en la cual señala que el mayor poder digestivo para las harinas estudiadas es obtenido con la mezcla de las enzimas digestivas **Tripsina + Pepsina**, seguido por la Tripsina y el menor porcentaje de digestibilidad fue obtenido por la Pepsina.

DISCUSION DE RESULTADOS

Para iniciar la investigación se diseñó un experimento destinado a obtener un Heteroinjerto modelo: Se utilizó como parental materno una planta de la Clase Dicotiledónea, Familia Leguminosas, el frijol ICA CERINZA, ***Phaseolus vulgaris L.*** que posee alto porcentaje de proteína, bajo rendimiento y adaptación al medio ambiente, susceptibilidad a plagas y enfermedades, periodo vegetativo corto y excelente aceptación en el mercado y como parental paterno se utilizó una planta de la Clase Monocotiledónea, Familia Graminae, maíz OPACO ICA V 557 ***Zea mays L.*** con bajo porcentaje de proteína, altos rendimientos, amplia aceptación en el mercado, adaptación al medio ambiente y largo periodo vegetativo.

Se realizaron 172 heteroinjertos de los cuales se obtuvo un frijol denominado experimentalmente **2519**, que produjo abundantes semillas fértiles (**MORENO, 1994**), las cuales se propagaron y compararon en ensayos experimentales en 1995, en CORPOICA, Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias, hasta obtener en el segundo semestre de 1996, semillas suficientes de las generaciones F2 a F5.(**CORPOICA 94-96**).

Una vez obtenidas las semillas de las generaciones F1a F5, se procedió a realizar una selección de las mismas, con el fin de obtener una muestra lo suficientemente representativa que permita extrapolar los resultados obtenidos y asumir que los valores encontrados correspondan a las características del material estudiado.

Es importante aclarar que las semillas de las plantas presentan las siguientes características: (**GOLECKI, 1998**).

1. Es el órgano portador de las características genéticas de la planta, que mantiene la pureza varietal, pues los efectos ambientales no se transmiten por semilla. Las características de las plantas se transmiten por las semillas de generación en generación, cumplen con las leyes de la herencia que fueron encontradas por Mendel y corresponden generalmente a la descripción varietal que se hace sobre el fenotipo

observado de las plantas de una variedad y depende del potencial genético (genotipo) de la planta y de su expresión (fenotipo) que recibe el influjo de los efectos ambientales presentes.

2. Es el objetivo de los procesos del mejoramiento de plantas, que buscan aumentar la variabilidad genética y el rendimiento; modificar y aumentar la heredabilidad de los caracteres.
3. Es el órgano vegetal especializado en la mayoría de las plantas, para almacenar las proteínas de reserva para la nueva planta que se inicia con el proceso de la germinación.
4. La composición de las semillas no es afectada por la variación en los factores nutricionales de las plantas o del medio ambiente, durante el crecimiento. Es una fuente estable y permanente para la extracción de proteínas. **(ADRIAANSE, 1969)**.
5. El porcentaje de proteína de la semilla presenta alta heredabilidad y mayor estabilidad sobre el efecto del medio ambiente. **(POLIGNANO , 1982)**.

Por todas las razones expuestas anteriormente, se decidió iniciar la investigación de las proteínas presentes en las semillas de frijol 2519 bajo tres aspectos: 1- Determinación del porcentaje de proteína. 2- Establecer el perfil electroforético de las bandas de proteína en geles de poliacrilamida 3- Determinar la digestión *In vitro* de las harinas crudas con enzimas digestivas.

1. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE PROTEINAS

De acuerdo al procedimiento estandarizado para la extracción de proteínas, se analizaron 30 muestras de semillas seleccionadas, de cada uno de los materiales a estudiar: maíz Opaco frijol Cerinza y progenies F1 a F5 del frijol 2519.

En la **TABLA 4**, citada anteriormente, observamos que los valores máximo y mínimo de proteína en el frijol ICA CERINZA son 21.16% y 15.4%. Estos valores se pueden comparar con los valores máximos y mínimos de las progenies fueron 25% y 18.3%. Si comparamos estas cifras encontramos que el valor mínimo en las progenies del frijol 2519 es mayor que el valor promedio del frijol ICA CERINZA. (17.9 %). Una representación de estos valores se ve en el **GRAFICO No. 1**.

Un detalle de bastante importancia es la comparación de los valores del coeficiente de variabilidad, que nos permite asumir que en las muestras

de las semillas de la variedad maíz Opaco hay menos uniformidad y por consiguiente se ve reflejado en su porcentaje de proteína (las semillas tienen origen en polinización cruzada, son heterocigotas); comparadas con las semillas de frijol ICA Cerinza y 2519 (semillas de origen homocigoto), que presentan bajos valores para este coeficiente y altos porcentajes de proteína.

Sin embargo comparando los casos de los frijoles se nota que el ICA Cerinza presenta mayor coeficiente de variación en las muestras de proteína frente al valor promedio para las progenies del frijol 2519, lo cual nos da idea de la posible mayor estabilidad en las generaciones siguientes del material 2519, debido a que con el tiempo se van estabilizando los caracteres por la tendencia a la homocigosis debida al proceso de la autopolinización.

Análisis estadísticos de los datos obtenidos para porcentaje de proteína entre las progenies del Frijol 2519 y el frijol parental ICA Cerinza, mostraron diferencias altamente significativas.

Actualmente se desconoce el porqué de este aumento de proteína en las progenies; sin embargo, **BERNAL**, observó resultados similares en los análisis de los estudios realizados en muchas de las plantas que obtuvo y propuso que, “estos incrementos en proteína se deben a la influencia de la planta padre sobre la planta madre”. (**BERNAL y MORENO, 1981**)

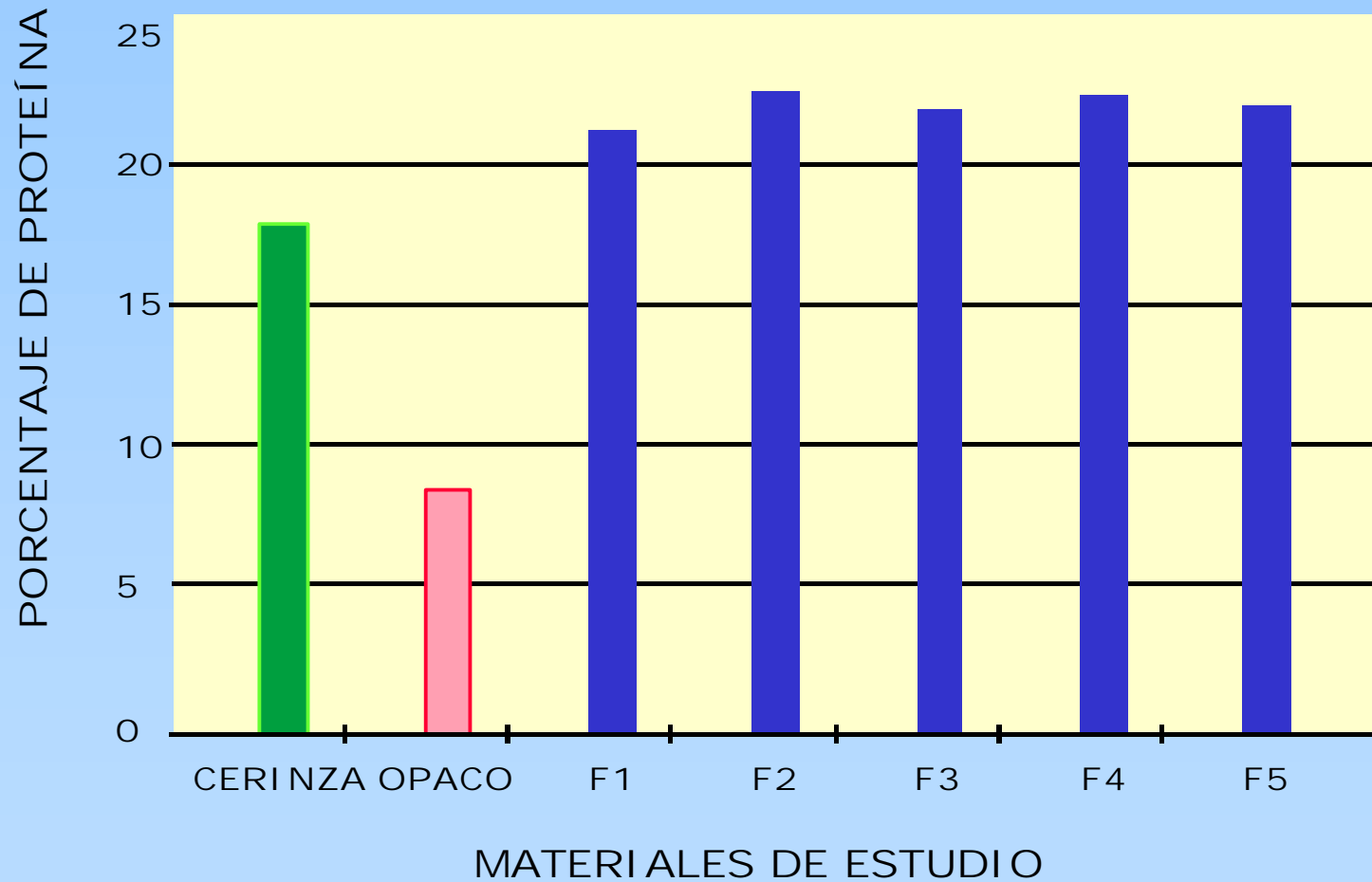
Esta afirmación no se encuentra sustentada en investigaciones y además no aclara el porqué del incremento de la concentración de proteína en las progenies experimentales 2519. No hemos encontrado ninguna otra referencia bibliográfica al respecto.

Por otro lado se ha reportado que aquellas proteínas que tienen pocos residuos de aminoácidos que tengan anillos aromáticos como Histidina, Tirosina, Fenilalanina y Triptófano, tienen baja absorbancia a 280 nm. Se sabe que la relación entre concentración de proteína y absorbancia es lineal y que las proteínas absorben luz activamente en la región UV con dos máximos de 280 y 260 nm (**STOSCHECK, 1990**).

Las anteriores afirmaciones pueden soportar el supuesto que las progenies del frijol 2519 posean mayor cantidad de algunas proteínas que son ricas en los aminoácidos que tengan anillos aromáticos y por tanto presenten lecturas mayores al UV que como resultado de los cálculos realizados dan mayor concentración de proteína en la muestra.

Sin embargo esto no explica porque o cómo aparecen estas mayores cantidades de proteína en el frijol 2519, en diferencias que son altamente significativas. Revisando literatura se han encontrado algunos artículos que parecen dar respuesta a estas inquietudes específicamente en el

GRAFICO No. 1. PORCENTAJES DE PROTEÍNA EN PARENTALES Y MATERIALES EXPERIMENTALES 2519



campo de la variación genética lo cual podría ser una de las posibilidades que implicaría cambio al nivel génico y por ende al nivel proteínico.

Anteriormente citamos la referencia de **POLIGNANO, 1982**, quien afirma, junto con otros investigadores, que **la variación en el porcentaje total de la proteína en las semillas de fríjol estudiadas es una consecuencia de la alteración de la cantidad de las fracciones específicas de proteína**. En efecto, los genotipos con alto porcentaje de proteína están asociadas con un incremento en la cantidad de algunas subunidades especialmente la fracción denominada G-1.

Del supuesto anterior resulta una nueva inquietud con respecto al origen genético de las proteínas que se han cuantificado en los materiales experimentales: ¿ Son propias del fríjol, del maíz o son el resultado de un posible híbrido?.

Por otro lado, **OHTA, 1991**, pudo demostrar a través de microscopía electrónica, que en su injerto genético **hay transferencia de cromatina**, del patrón al injerto a través del sistema vascular, hacia los primordios florales y / o puntos de crecimiento (yemas), del injerto produciendo modificaciones morfológicas por cambios al nivel génico (homocigoto pasa a heterocigoto y viceversa; dominante pasa a recesivo y viceversa).

De igual forma, las experiencias publicadas por **WHITE 1992**, muestran que en los injertos realizados en fríjol se adquieren características en la descendencia que implican **modificación genética**, específicamente en la familia de genes **DI**, que en muchos cultivos (trigo, cebada, arroz, maíz, tomate y alfalfa), se ha identificado como la causante del enanismo.

Si se tienen en cuenta las anteriores observaciones, y tratando de aplicarlas a nuestro problema, podemos sugerir la posibilidad de que en el caso de las progenies del fríjol 2519, también se hayan adquirido características que impliquen modificaciones al nivel genético, por efecto del Heteroinjerto del maíz Opaco sobre el fríjol, específicamente en el incremento del porcentaje de proteína.

Esta podría ser una explicación sobre el incremento de la cantidad de proteína de reserva del grano de fríjol en la primera generación F1 y que esta característica cuantitativa sea heredada, tal cual se observa para los valores obtenidos en las siguientes progenies hasta la F5.

2. ELECTROFORESIS

Para tratar de dilucidar entre estas posibilidades se procedió a realizar pruebas electroforéticas utilizando dos protocolos diferentes de extracción

de proteínas, específico para cada parental, e incluyendo en cada uno las muestras correspondientes a las progenies con el fin de estar seguros de que todas las proteínas fueran extraídas de acuerdo a cada método, y analizar en esta forma si existen diferencias o semejanzas en los perfiles electroforéticos que se generen.

Como se observa en la **TABLA No. 3**, las muestras presentan diferentes concentraciones de proteína, lo cual implica la necesidad de tratar de aplicar similar concentración de proteína en las diferentes muestras y para ello se calcularon los diferentes volúmenes de extracto de proteína con el fin de poder comparar las bandas resultantes en los geles.

Para corregir estas diferencias, se tuvo en cuenta el porcentaje de proteína de cada material objeto de estudio, para así calcular el volumen final de la muestra aplicada al momento de la estandarización de la técnica.

En lo referente al porque del uso de estos protocolos, se debe al interés fundamental de responder a los supuestos que se plantearon en la sección anterior:

1. El uso del protocolo de extracción de proteínas de Frijol, tipo CIAT, en maíz y en las progenies de frijol 2519, es para observar las posibles diferencias y/o semejanzas entre las proteínas extraídas y que se puedan observar en las movilidades relativas de las bandas de proteínas, en los geles, y que correspondan a los parentales frijol ICA CERINZA y maíz Opaco y las progenies del frijol 2519.
2. El uso del protocolo de extracción de proteínas para maíz tipo LANDRY y MOUREAUX, en el frijol y progenies del 2519, es para observar el posible caso de que proteínas de maíz hubiesen pasado a las progenies del material experimental, según lo plantea GOLECKI.
3. Electroforesis de proteínas nativas para detectar si hay alguna similitud en la movilidad relativa entre las proteínas de maíz con las del frijol Cerinza o con las de las progenies del frijol 2519.
4. Electroforesis de proteínas desnaturalizadas SDS-PAGE para definir si algún monómero de proteína de maíz aparece en las proteínas de las progenies de los frijoles experimentales y además observar la similitud o diferencia entre proteínas de parentales Maíz Opaco, TM, y Frijol Cerinza, TC y progenies de los frijoles 2519.

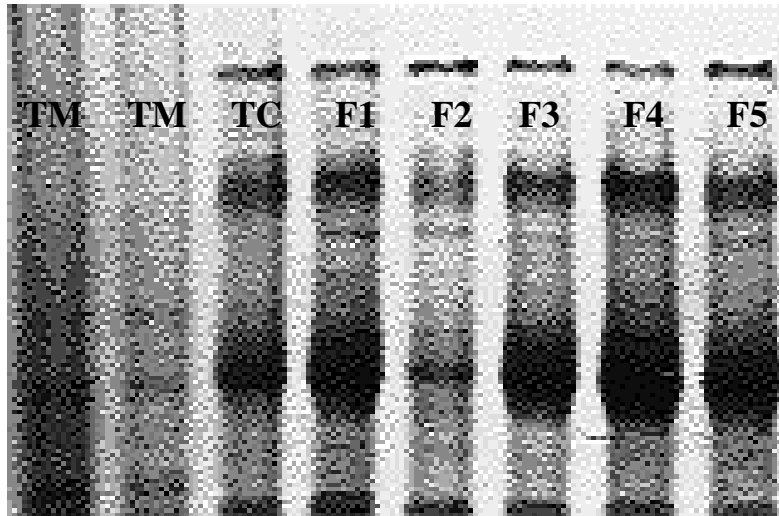


FIGURA No. 3 Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida del 12% con protocolo de extracción tipo maíz. Parentales Maíz Opaco TM, 15 y 10 uL, frijol Cerinza TC 10uL, Progenies F1 a F5 del frijol 2519, F2 5uL, F1 a F5 , 7.5 uL.

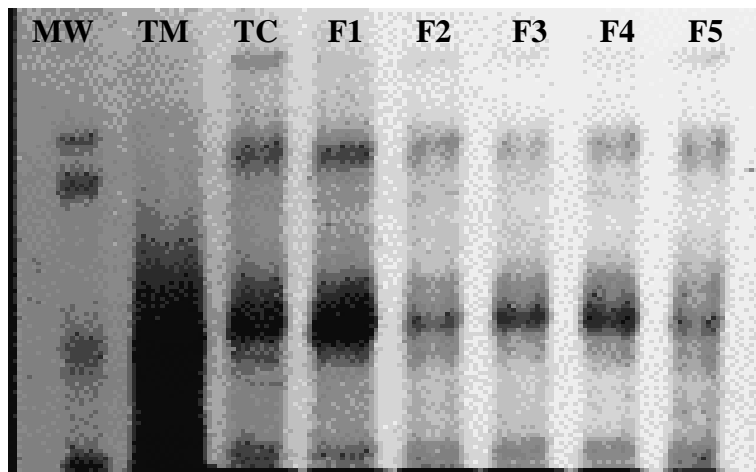


FIGURA No. 4. Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida del 12%. Protocolo de extracción tipo frijol. Parentales Maíz Opaco TM 20 uL, frijol Cerinza TC 10 uL, Progenies frijol 2519: F1, 7.5uL; F2, 3.5 uL; F3, 4uL; F4 5uL ;F5, 3uL ;MW Proteínas de peso molecular conocido.

2. 1. Electroforesis de proteínas nativas extraídas con protocolo para frijol, tipo CIAT.

El estudio de los geles de poliacrilamida con proteínas nativas, **FIGURAS No. 3 y 4**, muestra que las proteínas de maíz no presentan buena separación; se observan diferencias notables entre las muestras del maíz Opaco, lo cual puede deberse a la alta variabilidad que presenta la semilla, que como se sabe es el producto de una polinización cruzada que tiende a la heterocigosis. La variabilidad es alta y se puede observar en la **TABLA No. 3**.

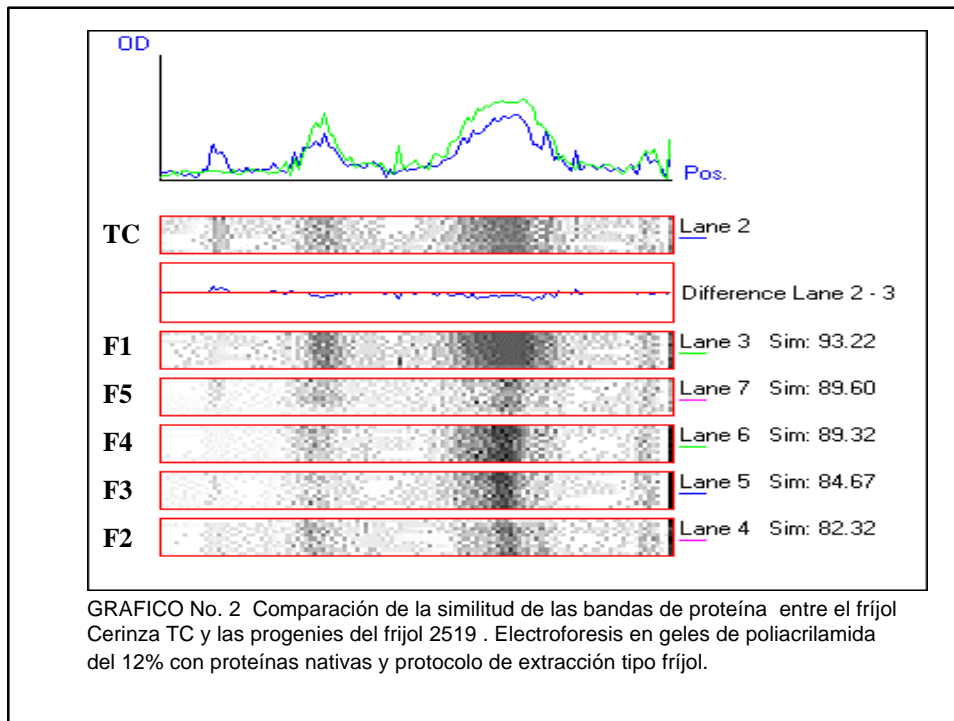
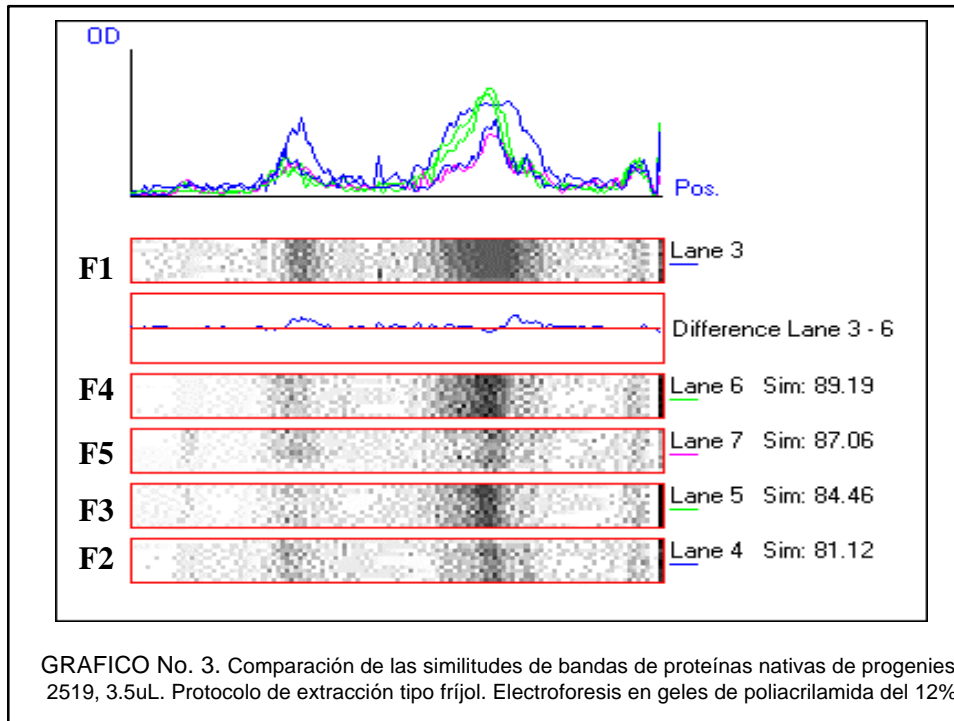
Las proteínas de los frijoles, presentan buena separación y no se observan diferencias notables entre las muestras de frijol Cerinza y progenies del frijol 2519; por un lado porque el protocolo es específico para frijol y por otro por las características de las mismas semillas de frijol, que son el producto de la autopolinización y con tendencia a la homocigosis.

En las gráficas de análisis por densitometría de estos geles se encontró que la similitud entre las diferentes muestras del parental maíz Opaco, TM, es baja y la poca definición entre los grupos de bandas de proteínas indica que el protocolo para frijol no es muy eficiente para extraer proteínas nativas de muestras de maíz. Esto nos sugiere que las proteínas extraídas con el buffer específico para frijol, no están todas las que se hallan presentes en el maíz.

También se comparó el parental frijol ICA Cerinza y las progenies del frijol 2519, y se encontró que la similitud entre las muestras es alta, **GRAFICOS No. 2 y 3**. Esto coincide con el hecho de que las semillas del frijol tienen origen en una fecundación de tipo autogámico y por tanto las semillas dentro de una misma variedad tienen alto porcentaje de homocigosis y un valor bajo en su coeficiente de Variabilidad (TABLA 3).

En los geles con muestras de frijol se observan buena separación de las bandas y con bajas cantidades de muestra los geles dejan ver bandeamientos de proteínas bien definidos y que presentan proteínas de alto, medio y bajo peso molecular.

Se puede suponer que las proteínas del maíz son bastante diferentes de las de los frijoles, para permitir ser separadas de su matriz proteínica al pH en que se efectuó la extracción, también se observó que la mayor parte de las proteínas del maíz son de bajo peso molecular.



2. 2. . Electroforesis nativas de proteínas extraídas con protocolo para Maíz tipo LANDRY y MOUREAUX.

Las proteínas extraídas con el protocolo mencionado se aplicaron en los geles de poliacrilamida, tal como aparece en el protocolo estandarizado para esta técnica, y con diferentes muestras de proteínas de maíz y se observó buena separación entre las bandas, predominando las de mediano y bajo peso molecular. En los geles con muestras de proteínas del frijol ICA Cerinza y progenies del frijol 2519, se observan que predominan las bandas de proteínas de alto, medio y bajo peso molecular. **FIGURA No. 5.**

Se puede observar que no hay coincidencias de grupos de proteínas entre maíz y frijol, en extracciones con sal y/o con agua. Aparentemente la extracción con agua, muestra presencia de algunas proteínas en mayor cantidad que cuando se realiza la extracción con sal, especialmente con proteínas de bajo peso molecular.

También se analizaron y compararon geles con muestras de proteínas de maíz, **GRAFICO No. 4 y 5**; frijol y progenies **GRAFICO No. 6 y 7**; frijol extraídas con el protocolo para frijol y muestras de maíz extraídas con el protocolo para maíz, **GRAFICO No. 8**, Se encontró que los valores de las similitudes fueron mayores para las proteínas de maíz extraídas con agua frente a las de maíz extraídas con el protocolo CIAT y también mayores que para las del maíz extraído con sal.

Como conclusiones de las comparaciones de los geles obtenidos y de sus análisis, para estas dos metodologías de extracción, podemos anotar:

- El protocolo de extracción para frijol no permite una adecuada separación de las proteínas de maíz, pero sí permite una separación de las bandas de frijol, aunque no en una forma óptima.
- Con el uso del protocolo para maíz, se observa una buena separación de las bandas de proteína, tanto para las muestras de maíz como de los diferentes frijoles y sus progenies.
- Las movilidades de las proteínas son diferentes entre el maíz y el frijol, lo cual implica que las proteínas son de diferente peso molecular y a la vez sugiere la idea de que son bastante diferentes.
- Dentro del protocolo de extracción para proteínas tipo maíz se observa que es mejor la extracción con Agua que con Sal , aparentemente el agua extrae proteínas de diferentes pesos

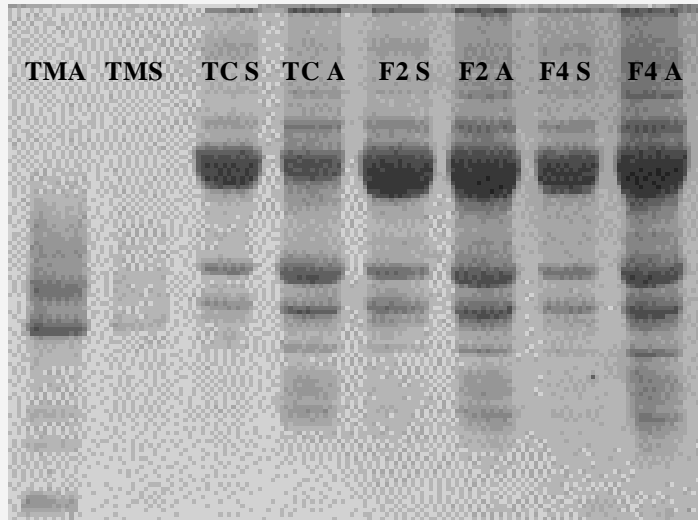


FIGURA No. 5 : Electroforesis en poliacrilamida del 12%. Comparación de bandas nativas de proteínas extraídas con Sal (S), con Agua (A), en maíz TM, frijol TC y en progenies F2 y F4 del frijol experimental 2519.

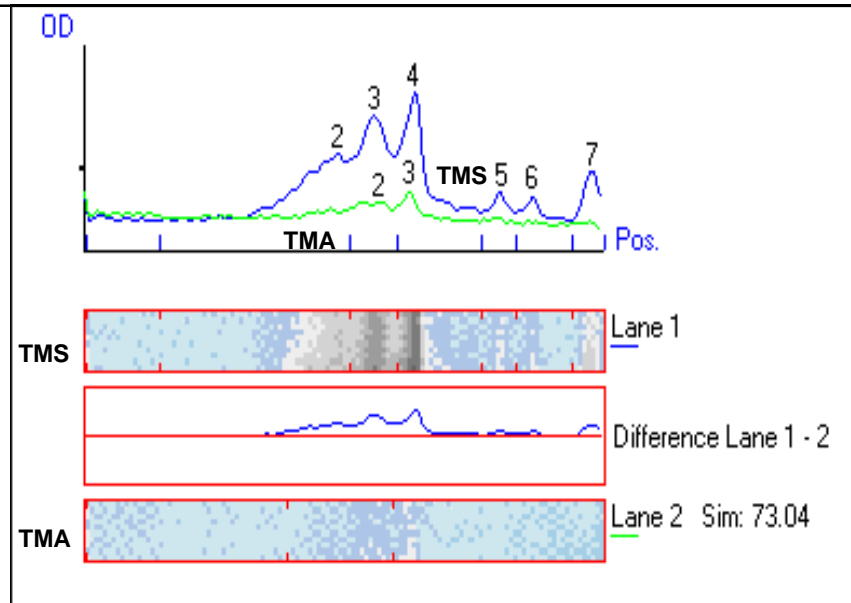
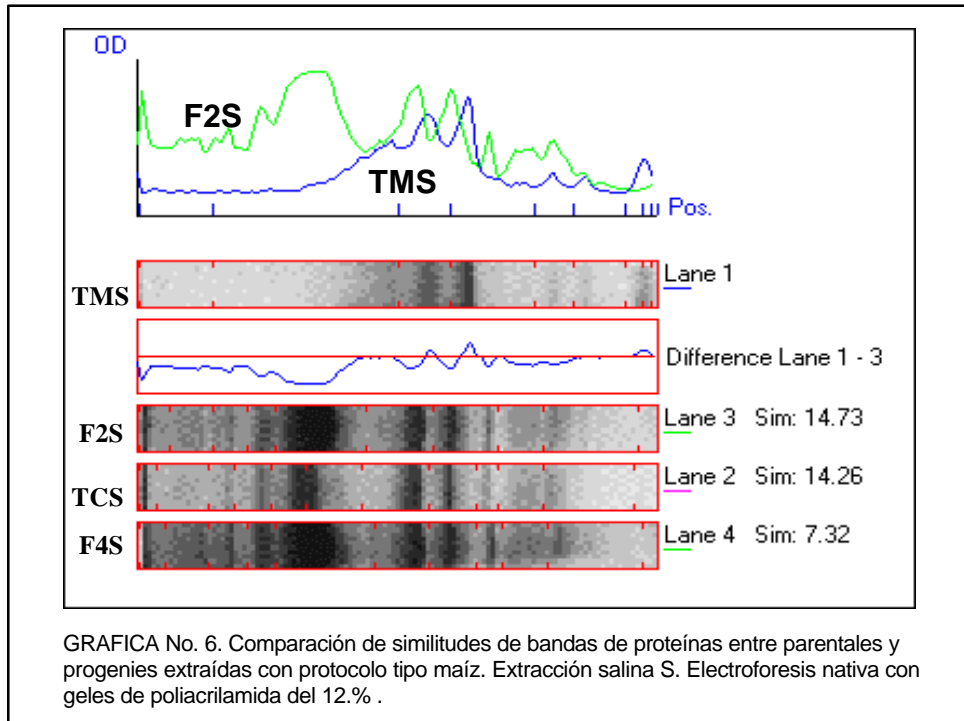
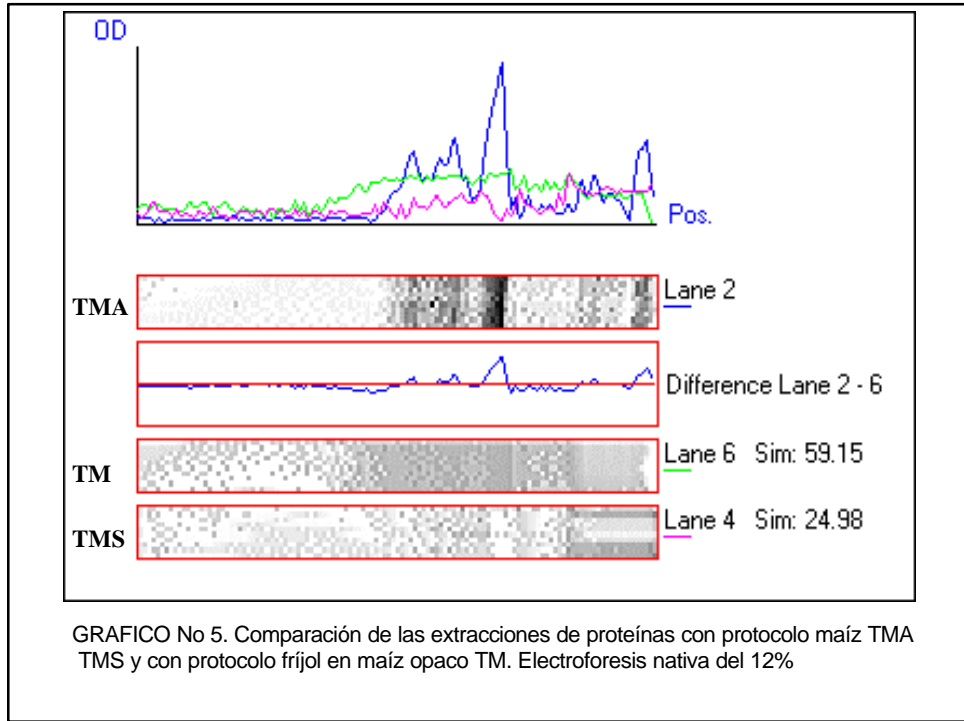
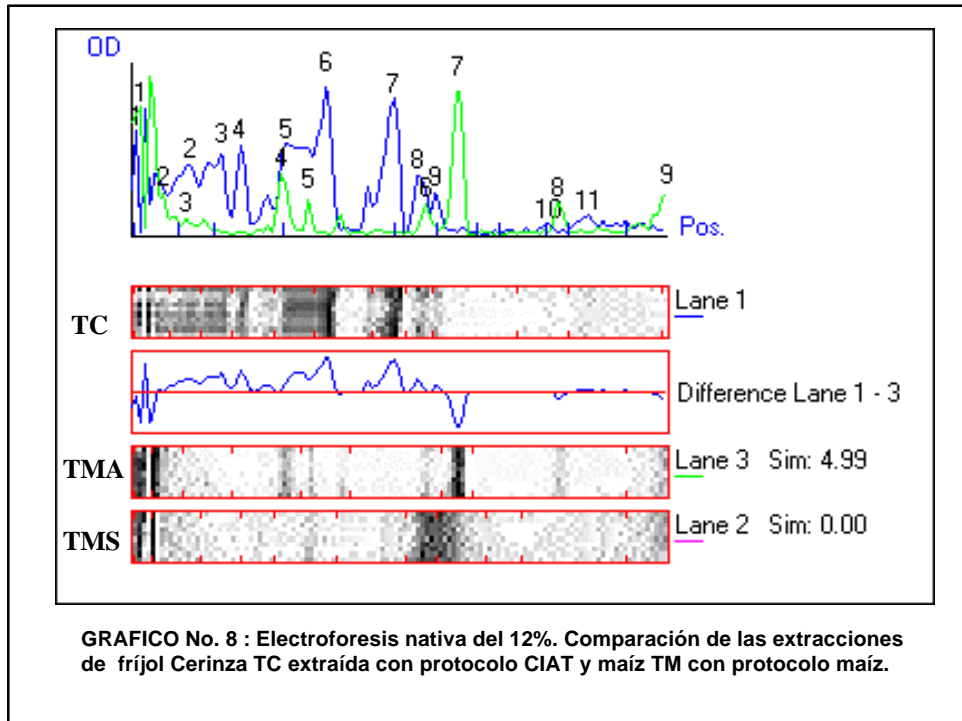
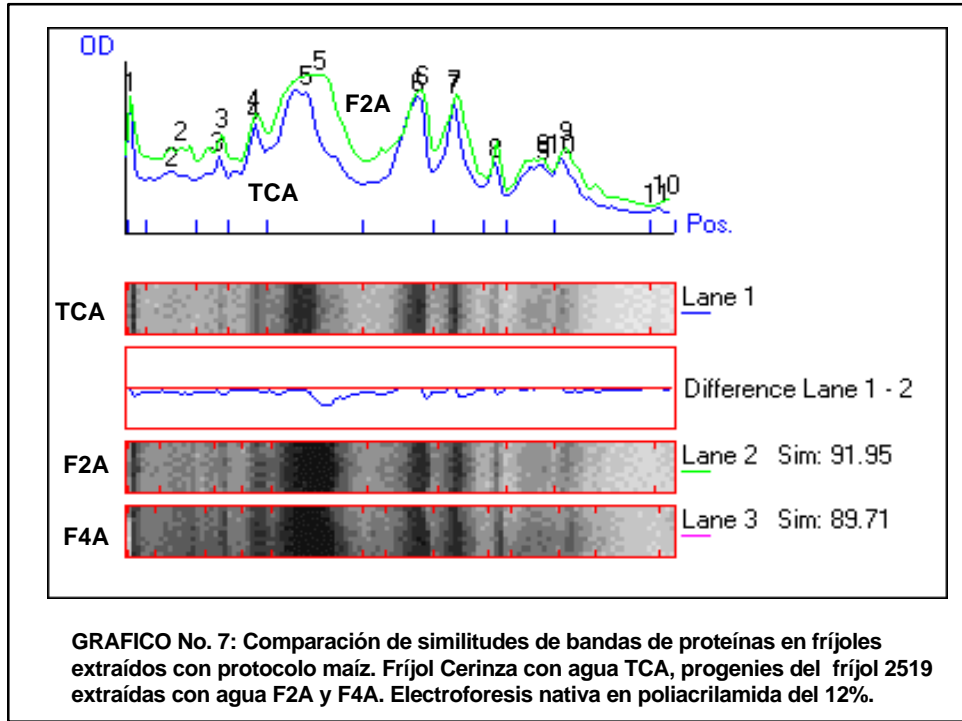


GRAFICO No.4: Electroforesis nativa del 12 % Extracción de proteínas con protocolo maíz Comparación de extracciones en Maíz opaco TM, con sal S y con agua A.





moleculares, mientras que la sal lo hace sobre proteínas de alto y medio peso molecular.

- Es bastante difícil conocer la proporción y clase de proteínas que se extraen con cada una de estas dos metodologías Agua y Sal, pues se observan proteínas de similar movilidad relativa, aunque en mayor concentración con agua que con sal.

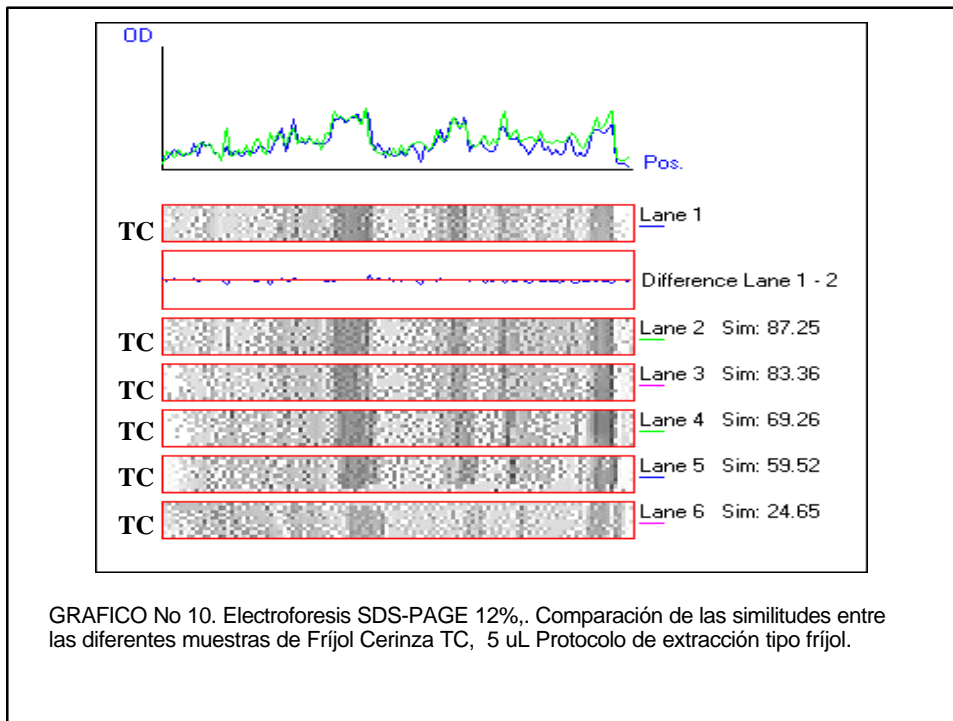
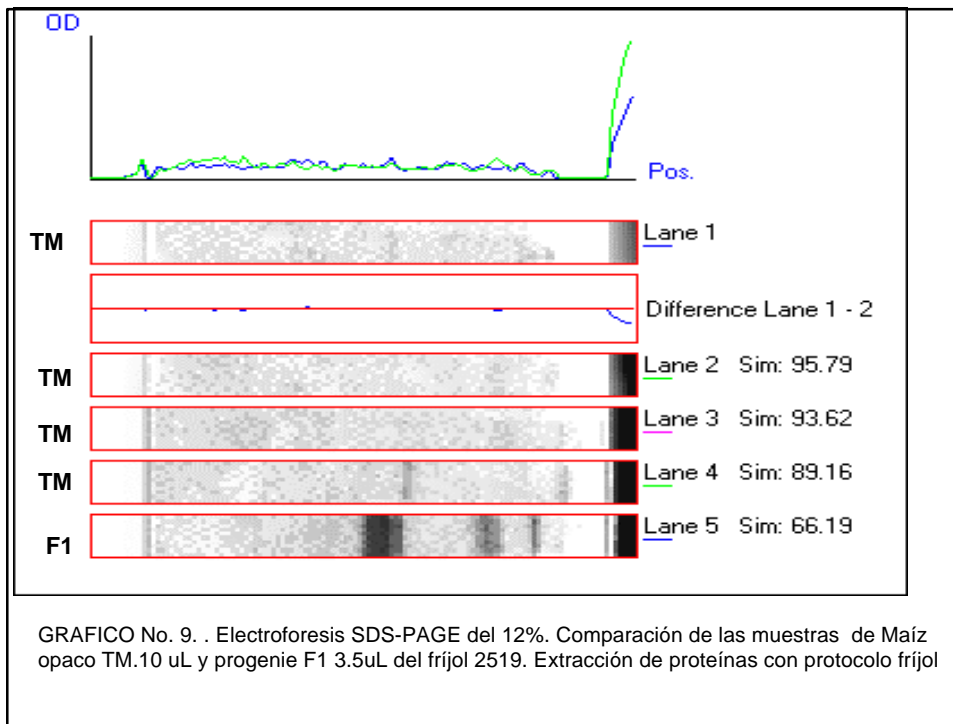
2.3. . Electroforesis SDS-PAGE de proteínas extraídas con protocolo para frijol, tipo CIAT.

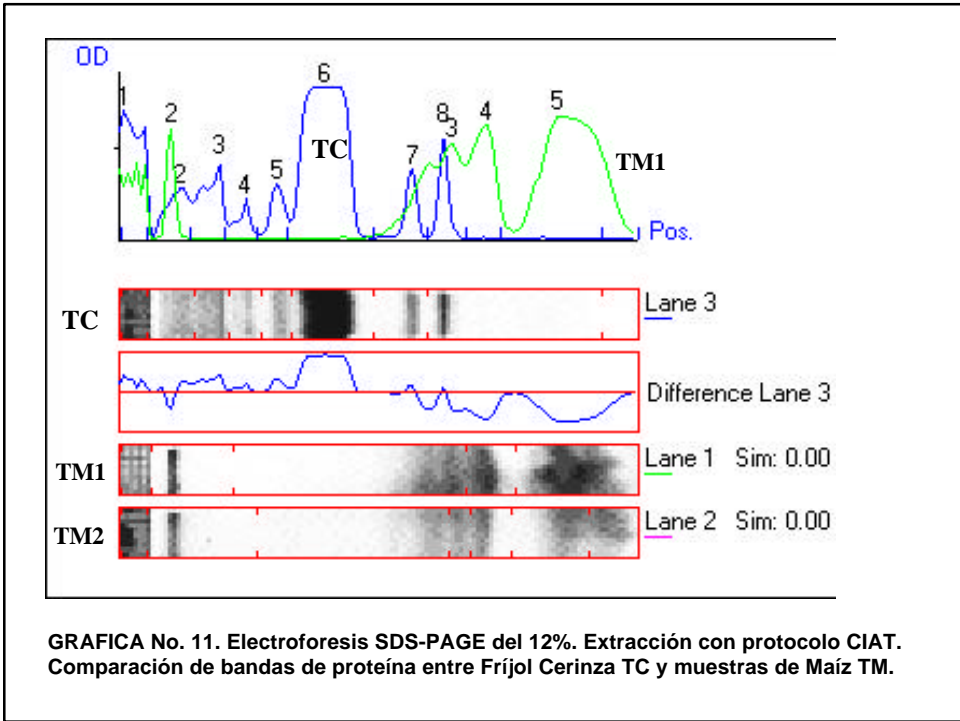
Se tomaron los volúmenes y concentraciones previamente estandarizados y anotados en la **TABLA No. 2**, para las diferentes corridas en geles SDS-PAGE del 12 %: para el parental maíz Opaco TM, 10 uL con dilución 2:1, para el parental frijol Cerinza TC, 5 uL con dilución 1:4 y para las progenies 2519, 3,5 uL, con dilución 1:5, con el fin de tener una concentración similar de proteína entre las muestras. Los volúmenes de muestra correspondientes a las proteínas usadas como marcadores de peso molecular fueron de 4 uL por cada gel.

Siguiendo la metodología que aparece en la sección correspondiente se anotaron las lecturas de las posiciones de las bandas de proteínas de peso molecular conocido, y que corresponden a los cm efectivamente corridos por dicha banda sin importar el frente de corrida. La posición de cada banda (**Pos**), fué corregida proporcionalmente a la longitud de corrida de 10 cm (**Posc**).

Con los nuevos valores obtenidos se calculó la movilidad relativa (**Mr**) que consiste en la relación entre la posición de la banda y la longitud del gel. Esto nos indica que además de la carga de la proteína, el peso molecular es un factor importante en estas separaciones por electroforesis SDS-PAGE, y que el desplazamiento de estas bandas en todos los geles fue similar y por tanto es posible relacionar con cada una de las ecuaciones obtenidas, Ver anexo No. 7, todas las bandas de proteínas de los geles.

De acuerdo a la cantidad de geles analizados, 18, y para los efectos de comparaciones adecuadas, se decidió establecer Rangos de Movilidad relativa, buscando agrupar las diferentes bandas de proteínas de tal forma que se evitara el translapo de bandas y que matemáticamente la separación o agrupación de las mismas estuviera sujeta a una norma, tal cual es el criterio de **CHAUVENET**, más o menos una desviación estándar del promedio de las movilidades relativas de las bandas.





GRAFICA No. 11. Electroforesis SDS-PAGE del 12%. Extracción con protocolo CIAT. Comparación de bandas de proteína entre Frijol Cerinza TC y muestras de Maíz TM.

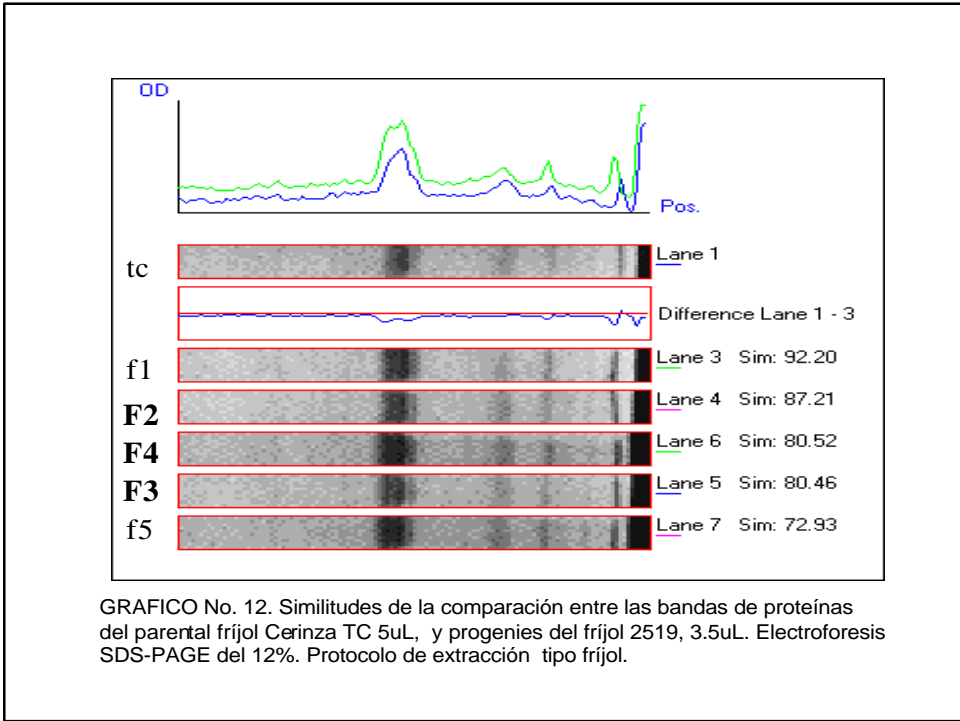


GRAFICO No. 12. Similitudes de la comparación entre las bandas de proteínas del parental frijol Cerinza TC 5uL, y progenies del frijol 2519, 3.5uL. Electroforesis SDS-PAGE del 12%. Protocolo de extracción tipo frijol.

Se diseñaron los rangos de separación de tal manera que cada uno (0.10 unidades) equivale aproximadamente a 0.6 cm de gel; de igual forma al agrupar estas movilidades relativas se tuvo en cuenta las correcciones ocasionadas al promedio por la suma o resta de su correspondiente desviación estándar.

Con el interés de estudiarlas se tomó como base del cálculo para comparación el número total de las bandas correspondientes al frijol Cerinza y proporcionalmente se encontró el número de bandas para el resto de materiales y luego se calculó un promedio para las 5 progenies. A continuación se obtuvo el porcentaje de bandas de proteínas que se situaron dentro de cada rango de movilidad relativa, **TABLA No. 5**.

La distribución de las proteínas en los geles SDS-PAGE del 12%, de acuerdo a su peso molecular y su movilidad relativa nos puede sugerir que la distribución de las proteínas aparenta ser diferente entre progenies del frijol 2519 y el parental Cerinza.

Se puede observar que las proteínas extraídas de las semillas de las progenies de frijol 2519 son aparentemente más constantes y están en mayor concentración. Es importante hacer notar que los volúmenes de muestra utilizados para las electroforesis siempre fueron mayores en el frijol Cerinza TC(5 uL), que en las progenies (3.5 uL) y además la dilución utilizada para este parental Cerinza fué 1:4, mientras que para las progenies era 1:5.

Al comparar **TABLA No. 7**, entre sí los parentales maíz opaco TM, **GRAFICA No. 9** se nota que la similitud es alta y al realizarla entre los frijoles ICA Cerinza TC, **GRAFICA No. 10**, se observa que es muy variable, de 25 a 97%, de igual forma se encontró que la similitud entre los parentales es bastante baja, **GRAFICA No. 11**. Contrastando con lo anterior, la similitud entre las diferentes muestras de progenies del frijol 2519, **GRAFICAS No. 12 y 13**, se encuentra que ésta varía entre el 72 y 99 %.

La inmensa mayoría de las proteínas de una sola célula se hallan presentes en cantidades muy reducidas. En las semillas, las proteínas de reserva se hallan en altas concentraciones (faseolina en frijol y zeína en maíz), necesarias para el inicio de los procesos de la germinación, y el resto de proteínas se encuentran en cantidades muy pequeñas, lo cual dificulta por tanto encontrar subunidades de proteínas supuestamente provenientes del parental maíz en concentraciones adecuadas para ser detectadas por los colorantes azul de Bromofenol y azul de Coomasie.

En consecuencia se puede pensar que las variaciones observadas en las movilidades relativas de las diferentes bandas de proteína en los geles analizados se pueden deber a las diferencias en las concentraciones de

las proteínas presentes en las muestras de los parentales y las Progenies, (Ver Anexo No. 4). Esto explica el por qué algunas bandas de proteínas no se observan con igual nitidez en todos los geles que se corrieron.

Se puede pensar que las variaciones entre las generaciones se deben a las reorganizaciones internas del genoma con cada nueva autopolinización que implica la aparición de Dominancia o recesividad de algunos genes y que permite expresiones diferentes en las sucesivas generaciones hasta que se logra una mayor estabilidad a lo largo del tiempo.

No se observa aparentemente en ninguno de los geles estudiados, coincidencia, (esta puede entenderse como bandas de proteínas que tengan igual movilidad relativa y proteínas de peso molecular similar), entre las movilidades relativas de las bandas de proteínas del maíz, con las de las progenies de frijol, esto implicaría algunas consideraciones:

- Contradecir lo propuesto por **GOLECKI**, (presencia de proteínas del portainjerto en el injerto), en lo referente a la posible presencia de proteínas de maíz opaco en el frijol 2519.
- Las proteínas del maíz en el frijol 2519, posiblemente se encuentran en cantidades muy pequeñas para ser detectadas por los colorantes del SDS-PAGE. Esto supone que al realizar nuevos heteroinjertos con el maíz Opaco sobre el Frijol 2519 se incremente la concentración de las mismas en la nueva descendencia y por lo tanto puedan ser detectadas las bandas de proteína en los geles.
- Suponer que únicamente se presentan modificaciones en el genoma del frijol 2519 (Se desconoce hasta la fecha el proceso que origina esta modificación) y que se ve reflejado en el incremento del porcentaje de proteína y en consecuencia en una mayor intensidad de las bandas en los geles SDS-PAGE, aceptando lo que afirma **POLIGNANO**, (**alteración de la cantidad de las fracciones específicas de proteína**).
- Los resultados anteriores pueden indicar que las bandas de proteínas observadas en los geles y provenientes de las harinas de las semillas del frijol 2519, obtenidas con el sistema del **Heteroinjerto de Bernal** (SQB), son propias del frijol y dando amplias posibilidades de adoptar lo propuesto por **OHTA** y discutido también por **WHITE** .en lo referente a **modificaciones en el DNA** produciendo variaciones de Homocigota a Heterocigota y de Dominante a Recesivo y viceversa.

Como consecuencia de las anteriores consideraciones surgen nuevas

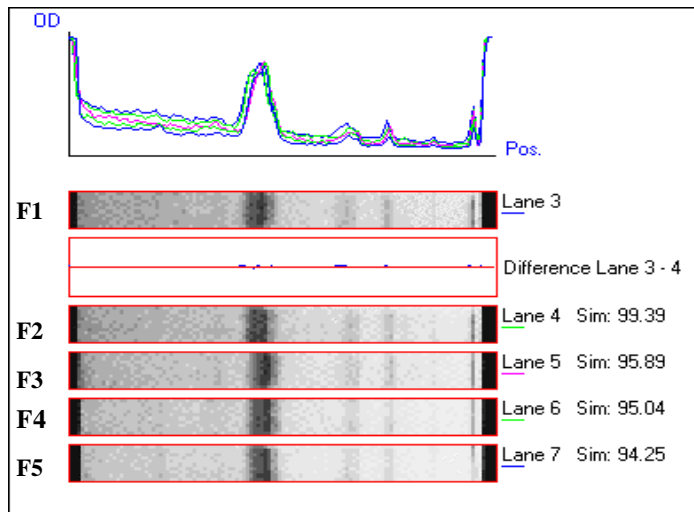


GRAFICO No.13. Electroforesis SDS-PAGE del 12%. Protocolo de extracción tipo fríjol. Comparación de la similitud de las progenies del fríjol 2519; 3.5uL.

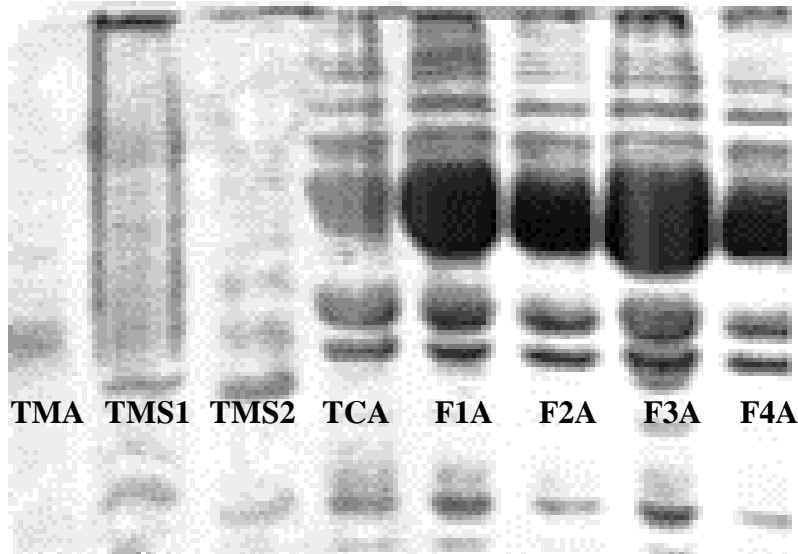


FIGURA No.6. Gel SDS-PAGE del 12%. Extracción de proteínas tipo Maíz. TM es el parental Maíz opaco, extracciones con sal S,20 y12.5 uL, agua A 10 uL. TC es parental fríjol Cerinza,10 uL; F1, a F4 son progenies del fríjol experimental 2519, 10 uL para cada uno.

inquietudes al respecto:

- Si no hay proteínas de la planta parental paterno en las semillas del material obtenido por heteroinjerto, cómo se explica el hecho de que al realizar sobre un mismo tipo de parental heteroinjertos con diferentes parentales paternos, se observen diferentes resultados en cuanto a porcentajes de proteína y otras características?
- De qué manera influye el heteroinjerto sobre las células de las yemas de la nueva planta para lograr obtener modificaciones sobre el DNA?
- Es posible direccionar el sentido del mejoramiento o de las mutaciones que se observan en las progenies resultantes?
- Hay diferentes clases de modificaciones que producen los parentales y por tanto no hay dos parentales que produzcan iguales resultados?

2. 4. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas extraídas con protocolo para Maíz tipo LANDRY y MOUREAUX.

Con el protocolo para la extracción de proteínas tipo maíz, se observó una buena separación de las bandas de proteínas, **FIGURAS No. 6 y 7**. La comparación entre muestras extraídas con sal y con agua permite ver algunas diferencias importantes con en el tipo de proteína extraído.

La similitud observada entre las bandas de proteína **TABLAS 8 y 9**, extraídas con sal y con agua en el parental maíz TM varía del 13 - 54 %. **GRAFICO No. 14**, lo cual nos da una idea acerca del tipo de proteínas extraídas con sal (glutelinas) y extraídas con agua (globulinas, albúminas)

Al comparar la similitud entre el parental Maíz TMA y el parental frijol Cerinza TCA, **GRAFICO No. 15**, se observa que la similitud es inferior al 5% y que la definición de las bandas en estos geles es bastante alta.

En el caso de la extracción con sal, **GRAFICO No. 16**, la comparación de la similitud entre el parental Cerinza y los valores de las progenies del frijol 2519 estuvo entre 57 y 92 %. La similitud encontrada para los geles con proteínas extraídas con sal, **GRAFICO No. 17**, varió entre 35 y 81%.

Comparando los dos procedimientos de extracción de proteínas y su perfil electroforético SDS-PAGE, se puede observar que:

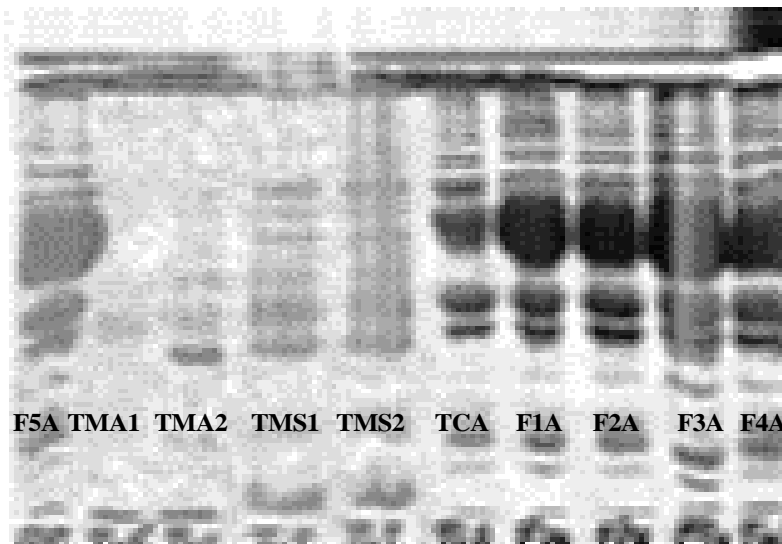


FIGURA No 7. Electroforesis SDS-PAGE 12%. Protocolo de extracción tipo maíz: TMA1, 7.5 uL ,TMA2 10 uL , TMS1 15 uL, TMS2, 20uL, TCA 15 uL, F1A a F5A, 12.5 uL.

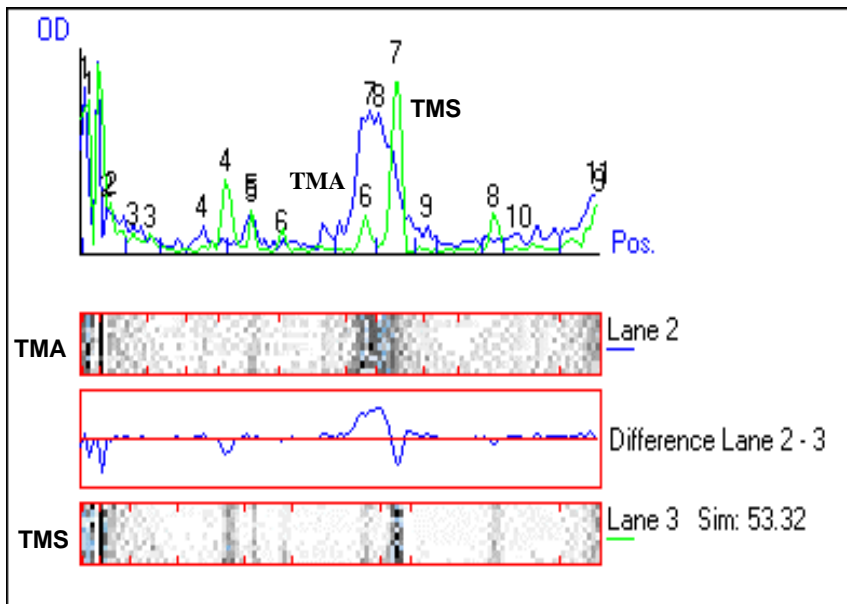
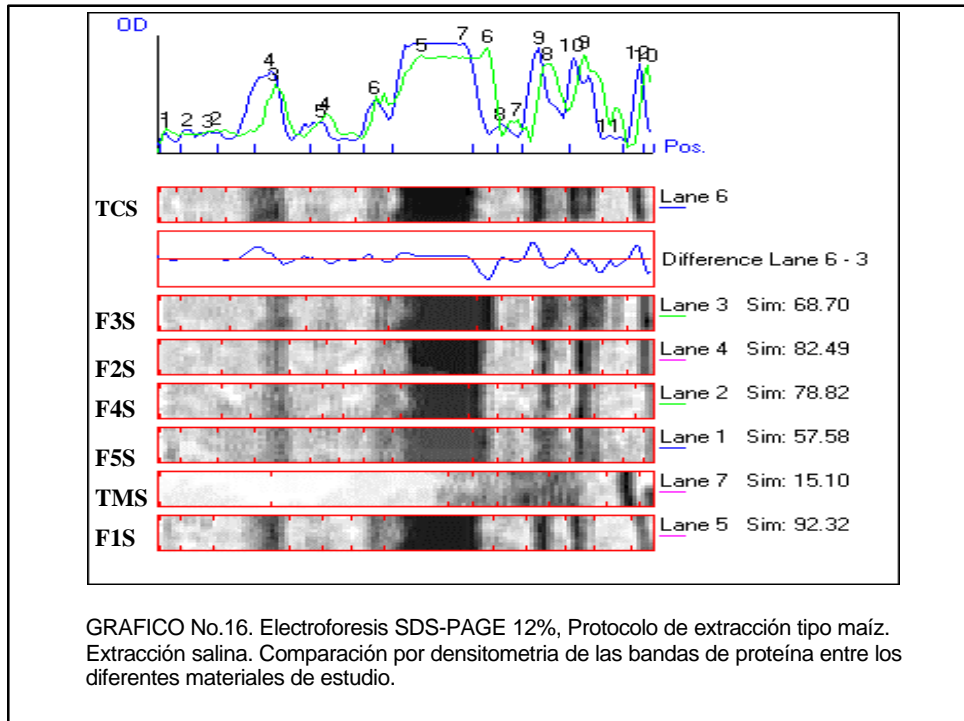
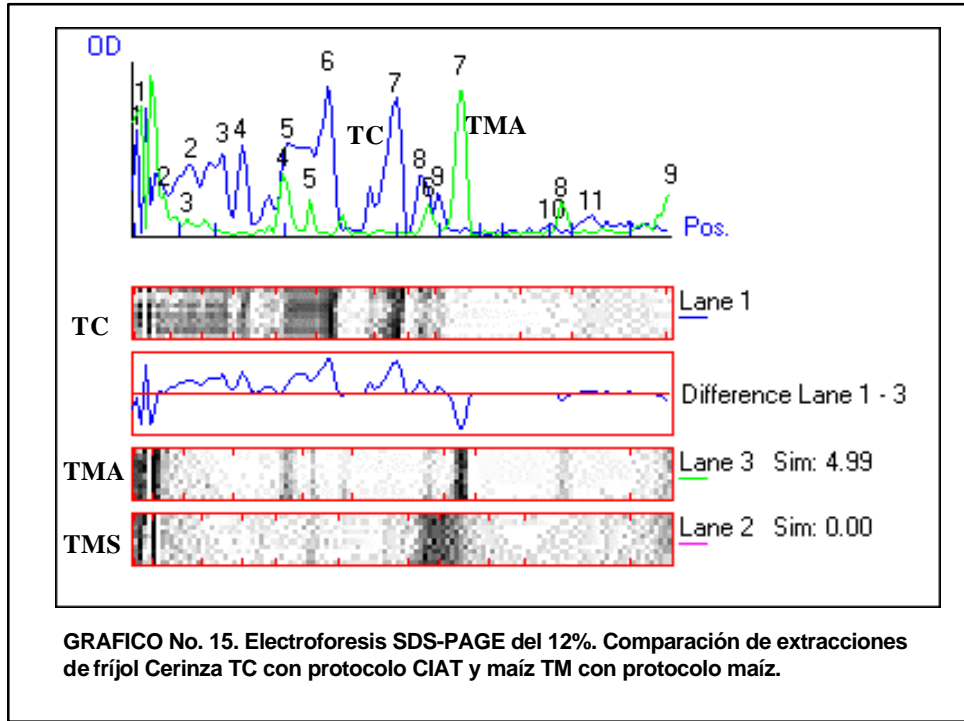


GRAFICO No. 14: Electroforesis SDS-PAGE DEL 12%. Extracción de proteínas con protocolo Maíz. Comparación de la extracción con agua A, y con sal S en Maíz TM.



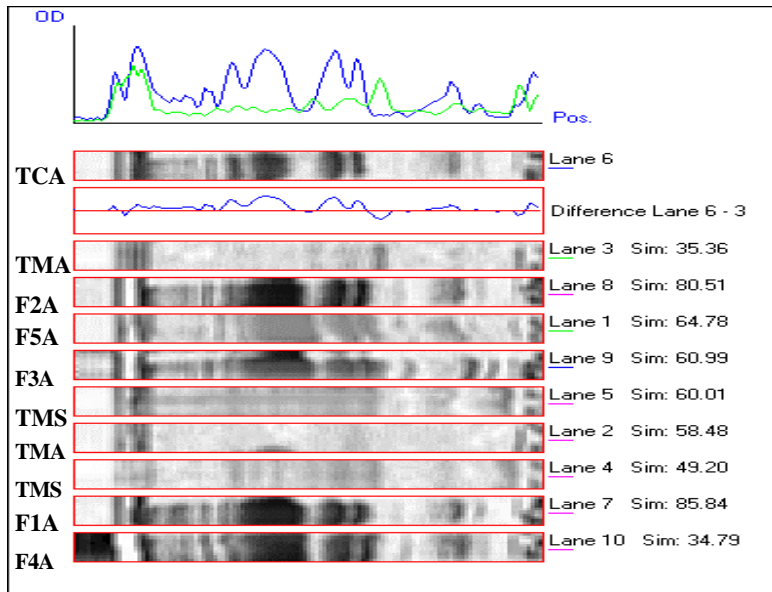


GRAFICO No.17. Electroforesis SDS-PAGE 12%, protocolo de extracción tipo maíz. Similitud entre bandas de proteína, obtenida por densitometría entre parental TC y Parental TM y progenies del Fríjol 2519. Extracción con Sal S y con agua A.

- El protocolo de extracción de proteínas tipo frijol, muestra un perfil electroforético característico, en el cual la extracción de proteínas es total y por tanto el perfil que se obtenga puede citarse como referencia para la variedad o clase de frijol que se investigue.
- En el caso de la extracción con el protocolo maíz, se observa que se presentan dos opciones en las cuales no es fácil conocer la cantidad de proteína que extrae cada uno de los dos procedimientos, lo que se refleja en una mayor dificultad para relacionar las bandas de proteínas.
- Sin embargo, cada una de las metodologías utilizadas muestra perfiles característicos que son reproducibles y que tienen sus propias características.

3. DIGESTIBILIDAD “ *in vitro*”.

Los resultados anteriores demuestran un mayor porcentaje de proteína en las progenies del frijol experimental 2519, frente al parental frijol ICA CERINZA. Sin embargo una mayor concentración de proteína no asegura su utilidad en la nutrición, a no ser que esta proteína sea suficientemente digerible, por lo tanto, con el objeto de asegurar si la proteína de la progenie es diferente o igual a la del parental se procedió a realizar la digestibilidad *in vitro* de estas proteínas

Los resultados anteriores demuestran un mayor porcentaje de proteína en las progenies del frijol experimental 2519, frente al parental frijol ICA CERINZA. Sin embargo una mayor concentración de proteína no asegura su utilidad en la nutrición, a no ser que esta proteína sea suficientemente digerible, por lo tanto, con el objeto de asegurar si la proteína de la progenie es diferente o igual a la del parental se procedió a realizar la digestibilidad *in vitro* de estas proteínas

Con los valores encontrados podemos pensar que las diferencias en la actividad que muestra la enzima, se deba posiblemente a los contenidos o presencia de los aminoácidos sobre los que actúa la **Pepsina**, (es específica para hidrolizar el lado **amino** del enlace peptídico en los aminoácidos Leucina, ácido Aspártico y Glutámico, Fenilalanina, Tirosina y Triptófano), entre los parentales frijol ICA CERINZA y maíz OPACO y también entre el parental frijol y las progenies del frijol experimental 2519, tal como se ve en los valores de los porcentajes de las digestibilidades

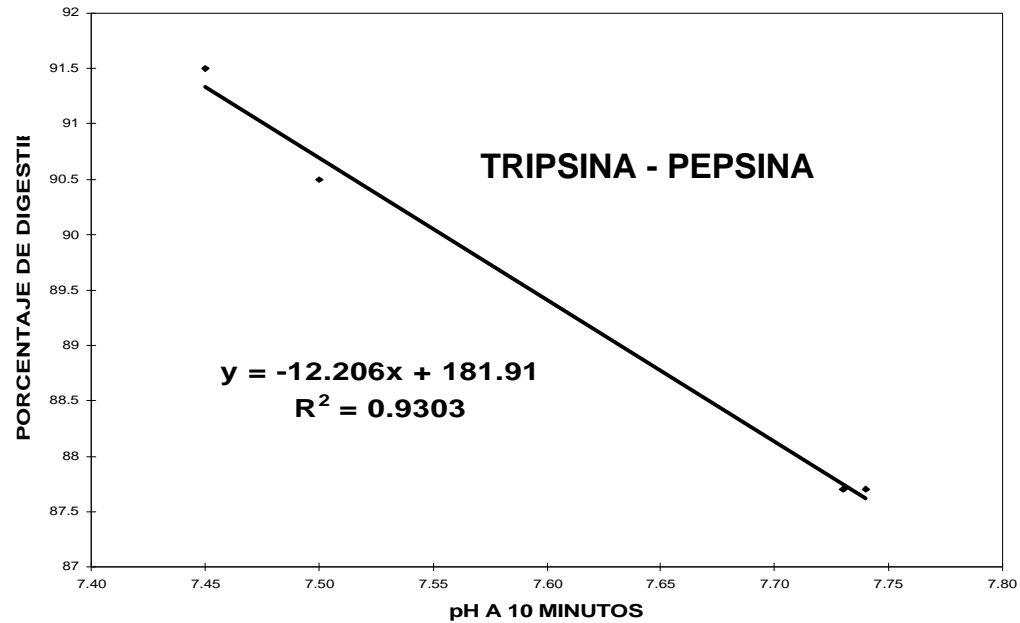
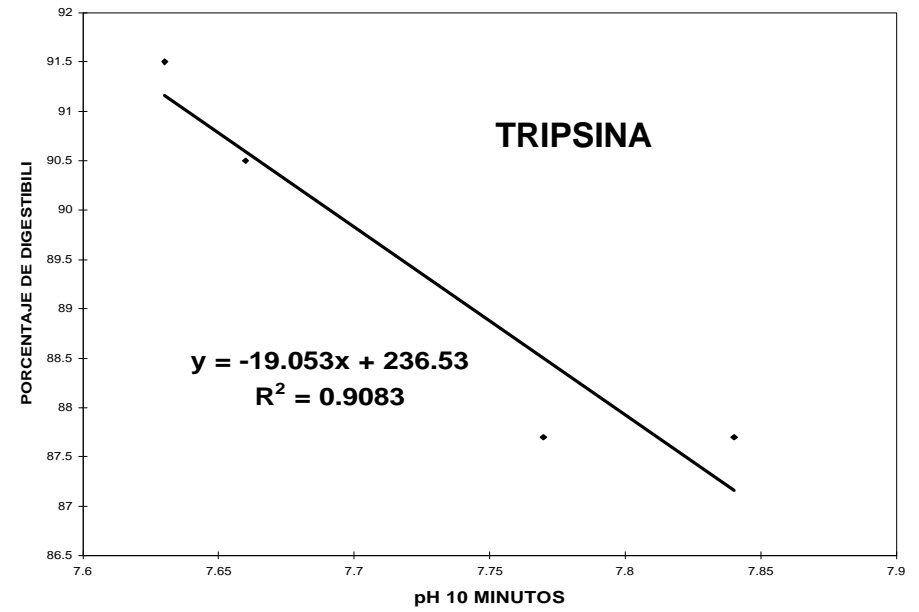
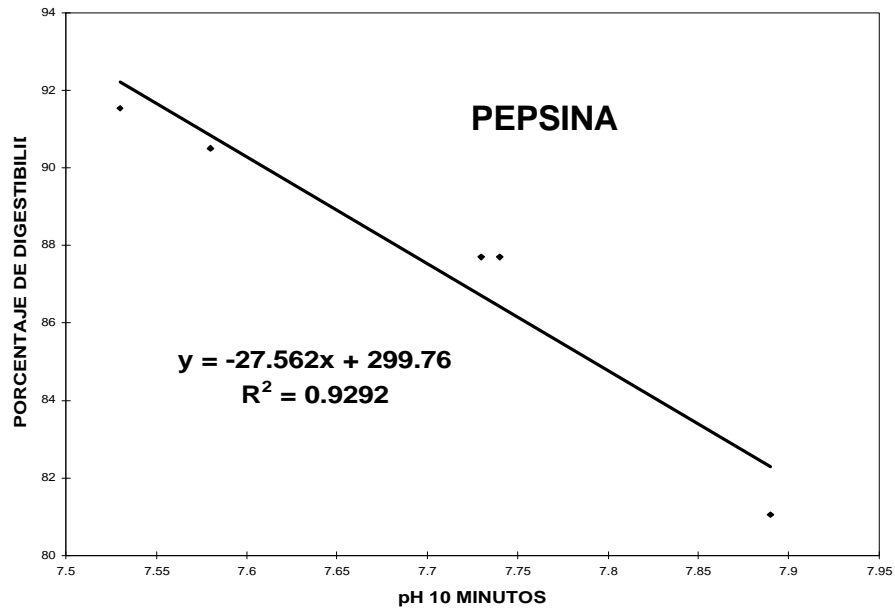


GRAFICO 18. Curvas de calibración de las enzimas Digestivas *In Vitro* sobre *Proteínas Puras*.

Con los valores encontrados es posible sugerir que las diferencias en la actividad que muestra la enzima, se deba posiblemente a los contenidos de esta clase de aminoácidos de las proteínas de los parentales frijol ICA CERINZA y maíz OPACO y de igual forma entre el frijol ICA CERINZA y las progenies del frijol experimental 2519 sobre los que actúa la **Tripsina** (hidroliza los aminoácidos polares por el **lado carboxilo** de los residuos de Lisina, Arginina), **SEIDL, 1969** tal como se ve en el orden calculado para los porcentajes de las digestibilidades

En la **TABLA No.10** se muestra un resumen promedio de las lecturas obtenidas para la mezcla de enzimas y los resultados se ven en la **GRAFICO No. 18**, la cual señala que el mayor poder digestivo para las harinas estudiadas es obtenido con la mezcla de las enzimas digestivas Tripsina + Pepsina, seguido por la Tripsina y el menor porcentaje de digestibilidad fue obtenido por la Pepsina.

Los datos obtenidos concuerdan con los resultados de **SEIDL, et al. 1969**. acerca de que las globulinas son las proteínas predominantes en las semillas de **Phaseolus** y algunas de ellas han mostrado ser resistentes a la hidrólisis por enzimas proteolíticas. (Faseolina del frijol y Zeína del maíz). La presencia en altas cantidades de tales proteínas en granos de leguminosas y cereales ofrece una explicación para la baja digestibilidad de la proteína que muestran estos granos.

En las gráficas se puede observar el porcentaje de proteína digerido por las enzimas, y que la cantidad digerida por cada enzima es similar. Se puede pensar que las pequeñas diferencias que se observan entre las enzimas Tripsina y Pepsina y en su mezcla, frente a su actividad sobre cada muestra de harina, implican que no se perdió digestibilidad entre las proteínas de las harinas de semilla de los materiales experimentales comparados con el material ICA CERINZA.

También se observa en el porcentaje de proteína digerido por las enzimas, que la cantidad de muestra digerida por cada enzima es similar. Se puede pensar que las pequeñas diferencias que se observan entre las enzimas Tripsina y Pepsina y en su mezcla, frente a su actividad sobre cada muestra de harina, implican que no se perdió digestibilidad entre las proteínas de las harinas de semilla de los materiales experimentales comparados con el material ICA CERINZA y que no es significativa la posible influencia del parental maíz OPACO sobre las progenies de los materiales experimentales 2519. **GRAFICO No. 19**.

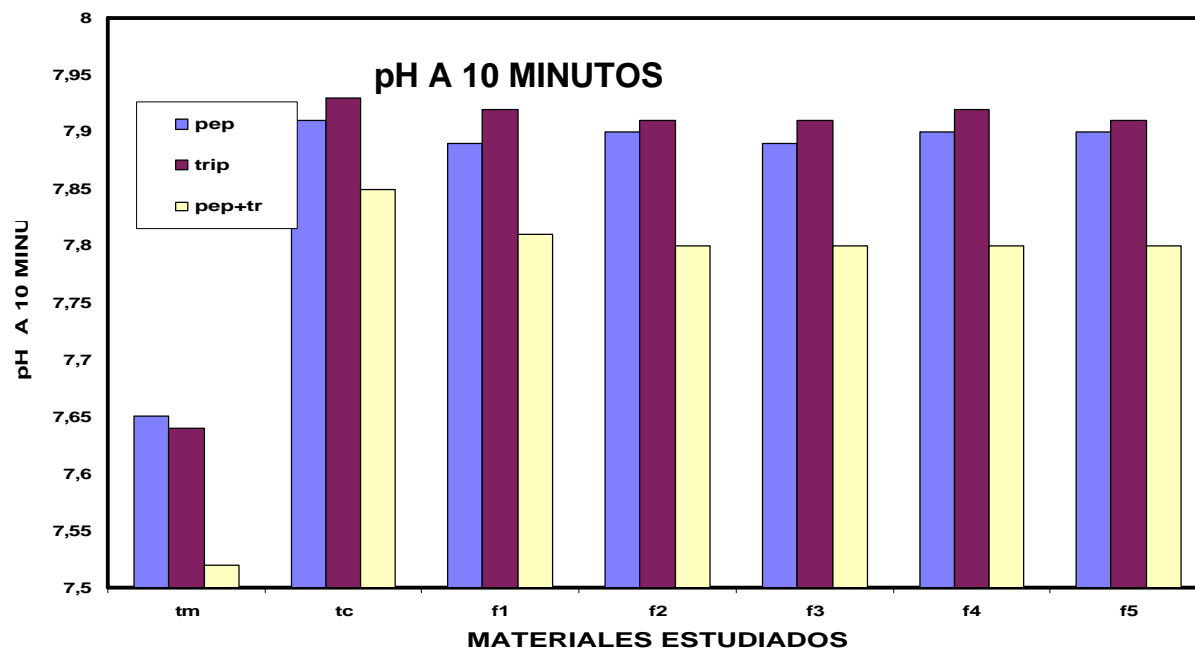
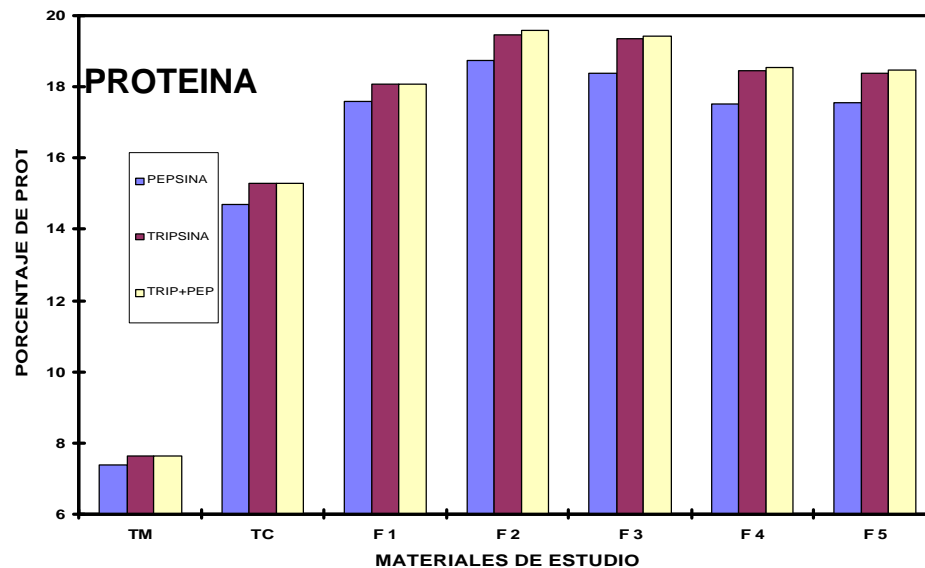
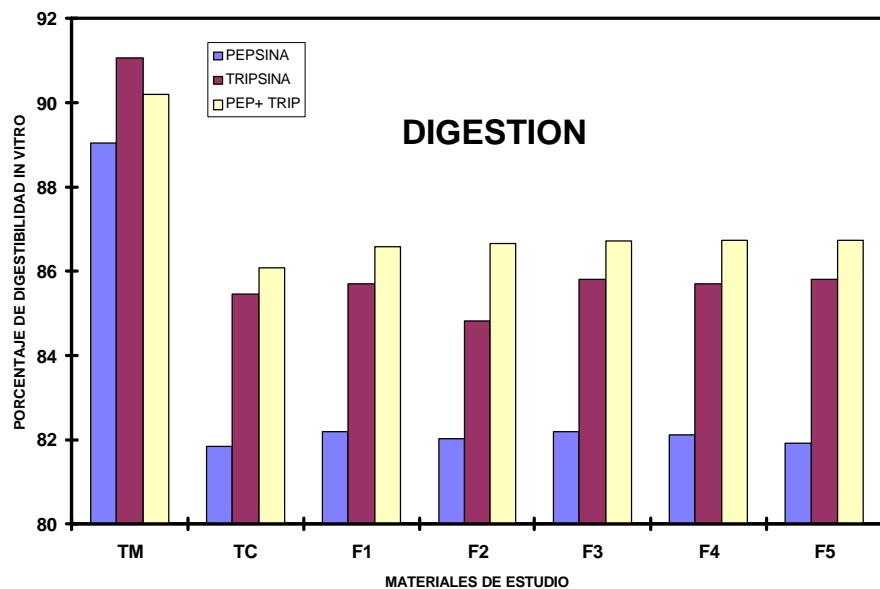


GRAFICO No. 19. Gráficos de Digestión, Proteína Digerida y pH a los 10 min. Con enzimas Digestivas

Se puede cuestionar si es o no significativa la posible influencia del parental maíz OPACO sobre las progenies de los materiales experimentales 2519. Sin embargo las modificaciones observadas aunque no son significativas nos pueden sugerir que:

- Aparentemente hay variaciones en las cantidades de los aminoácidos de las muestras, ya sea por mayor cantidad de algunos de ellos, tal como lo sugiere **POLIGNANO**, (La variación en el porcentaje total de la proteína en las semillas de frijol estudiadas es una consecuencia de la alteración de la cantidad de las fracciones específicas de proteína).
- La posible presencia de mínimas cantidades de proteínas del maíz presentes en las muestras de proteínas de las progenies 2519, tal como lo sugiere **GOLECKI**, (En injertos interespecíficos e intergenéricos realizados en Cucurbitáceas, se observó fuerte evidencia de la movilidad de proteínas estructurales del floema P1 y P2, a través de los injertos).

De todas maneras este experimento trata de dar una posible idea de cómo interactúan las enzimas digestivas sobre la harina de frijol, según el protocolo seguido, teniendo presente que en el sistema digestivo se procesan de otra forma los alimentos y que los frijoles son consumidos con las proteínas totalmente desnaturalizadas por efecto de la cocción a la cual han sido sometidos previamente.

CONCLUSIONES

1. La concentración de la proteína en las generaciones F1 a F5 del frijol 2519 se ha incrementado significativamente sobre la del frijol ICA Cerinza.
2. El incremento en proteína no se debe a la introducción de proteínas del maíz en las progenies del frijol 2519, ya que los patrones electroforéticos de las progenies son diferentes a las del maíz y también a las del frijol ICA Cerinza.
3. La digestibilidad de la proteína de las progenies del frijol 2519 es similar a la del frijol ICA Cerinza y estas son menores que la del maíz Opaco.
4. Dado el aumento en la concentración de la proteína en las progenies, cerca del 23%, se sugiere que el frijol 2519 puede tener ventajas sobre el frijol parental ICA Cerinza, en términos nutricionales.
5. La característica genética de mantener en las semillas una alta concentración de proteína, observada a lo largo de 5 generaciones, sugiere que el método de los HETEROINJERTOS BERNAL, permiten la producción de nuevas cultivariedades de plantas con la fijación de esta característica.
6. Se confirma que la metodología del Heteroinjerto Bernal (SQB), es de gran utilidad en fitomejoramiento por su sencillez y la rapidez en la obtención de nuevas cultivariedades.

RECOMENDACIONES

Determinar y cuantificar los aminoácidos presentes en las muestras de harina procedentes de las semillas del frijol ICA CERINZA y Materiales Experimentales del frijol 2519.

Realizar estudios que puedan determinar con exactitud el porque del aumento de la concentración de las proteínas que se expresan en las semillas de las progenies del frijol experimental 2519.

Diseñar la metodología necesaria para poder determinar las variaciones en la concentración de las proteínas, en el supuesto de que las que se expresan en el material experimental 2519 sean todas de origen parental materno, y cual es el mecanismo que se sucede para lograr esas diferencias tan altas en porcentaje (la llamada sobreexpresión génica).

Realizar estudios que relacionen la producción por planta y su correspondiente concentración de proteínas, de igual forma la germinación y el contenido de proteína en la semilla y estudios exploratorios que relacionen contenidos de proteína y resistencia o susceptibilidad a plagas y/o enfermedades.

Realizar investigaciones tendientes a confirmar o no la posibilidad de que a medida que se continúe con la multiplicación de las semillas (avance generacional) del material de frijol 2519 se van incrementando las diferencias entre el frijol parental y las progenies.

BIBLIOGRAFIA

ADRIAANSE, A. y J. E. ROBBERS, 1970. Characterization and fractionation studies on seed proteins of some of the leguminosae by starch - gel electrophoresis. J. Sci. Food Agric. 21 : 126- 127.

ADRIAANSE, A., W. KLOP y J. ROBBERS, 1969. Characterization of *phaseolus vulgaris* l. cultivars by their electrophoretic patterns. J. Sci. Food Agric. 20 : 647- 650.

AHN, J. K., L. C. SEN, J. R. WHITAKER, 1991. Stability of tertiary structure of phaseolin of red kidney bean as limiting factor in proteolysis. J of Food Biochem.15(4): 263-278

ANTI, A. B., 1991. Characterization of soybean and bean cultivars through electrophoresis. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. 148 p.

BAGGA, S., D. SUTTON, J.D. KEMP y C. SENGUPTA-GOPALAN, 1992. Constitutive expression of the b- phaseolin gene in different tissues of transgenic alfalfa does not ensure phaseolin accumulation in non-seed tissue. Plant Mol. Biol. 19 : 951- 958.

BAHAMON, M. y J. ROJAS. 1996. Identificación y evaluación de incidencia y severidad de las principales enfermedades en 25 materiales de frijol. (*Phaseolus vulgaris L.*) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Julio de 1996.

BARKER, R. D. J., E. DERBYSHIRE, A. YARWOOD y D. BOULTER, 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of *phaseolus vulgaris* l., and their intracellular and cotyledonary distribution. Phitochem. 15: 751-757.

BAUMAN, L. F., 1977. variabilidad del germen y del endosperma, elementos minerales, contenido de aceite y genes modificadores en el maíz opaco - 2. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional CIMMYT - PARDUE. "Maíz de Alta Calidad Proteínica", pp 41-61 . Méjico, Editorial Limura.

BEEBE, S., 1989. Mejoramiento genético en las redes de investigación colaborativa. Programa de Fríjol, CIAT, Cali, Colombia.

BERNAL, R y G. MORENO, 1981. El sistema químico biológico, (SQB). Fundación Bernalia, Documento de Trabajo (mimeografiado), Bogotá, Colombia, Mayo de 1981.

BERNAL, R y G. MORENO. 1978. Estudio de ocho nuevas variedades de plantas producidas en Colombia. Trabajo presentado a concurso en la Fundación Alejandro Angel Escobar. Bogotá, Colombia. Febrero 28 de 1978.

BERNAL, R. J., 1966. Gramalante, nuevo pasto de corte. Revista Agrícola y Ganadera. No.273. Cali, Colombia, Octubre de 1966.

BERNAL, R. J., 1968. El pasto Gramalante, hechos y ventajas. Separata Carta Agraria, No. 214. Caja de Crédito Agrario Industrial y Minero. Bogotá, Colombia.

BERNAL, R. J., 1975. Que se esconde bajo la sotana? Un científico o un charlatán. la revolución genética de José Bernal R., S.J. Revista Fenalce No. 8. Federación Nacional de Cerealistas. Bogotá, Colombia, Febrero de 1975.

BERNAL, R. J., 1979. El sistema químico biológico. Revista Javeriana No. 451. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, Enero- Febrero 1979.

BIOCHEMICA MERCK. 1977. Patrones de proteínas para la determinación del peso molecular por electroforesis con gel de poliacrilamida- sds. E. Merck, Darmstadt (R. F. de Alemania) , 11p.

BIO-RAD. 1997. Manual de la cámara de electroforesis Miniproteam II. Bio Rad.

BOHINSKI. 1991. Bioquímica. Addison- Wesley Iberoamericana. EU. 1991.

BRESSAIN, R., 1977. Mejoramiento de las dietas a base de maíz enriquecido con aminoácidos y proteínas suplementarias. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional CIMMYT - PARDUE. "Maíz de Alta Calidad Proteínica", pp 41-61. Méjico, Editorial Limura.

CARPENTER, K. J., 1981. The nutritional contribution of dry beans *phaseolus vulgaris* I in perspective. Food Technology 35(3) : 77-78.

CIAT, 1975. Situación del cultivo de frijol en América latina. Serie ES-19, 33p.

CIAT, 1989. Advances in bean *Phaseolus vulgaris*. research and production. Cali, Colombia. CIAT, 462p

CORPOICA. 1994-96. Libros de campo sobre experimentos de frijol. Tibaitatá, Mosquera. Libros de Campo, años 1995 y 1996.

CORPOICA. 1997. Programa nacional de nutrición animal. Resultado de Laboratorio. Tibaitatá, Junio 25 de 1997.

CRISCI, J. V. Y M. F. LOPEZ, 1983. Introducción a la teoría y practica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la O.E.A.. Washington D.C.

CHAVES, JOSE A.,1993. mejoramiento de las plantas. Editorial Trillas, 1 Edición. Madrid, España, 136 p.

DAVIS, J., 1985. Conceptos básicos de genética del frijol. Programa de Fríjol, CIAT, Cali, Colombia.

FAO, ALIMENTACION Y NUTRICION, 1990 Utilización de alimentos tropicales: frijoles tropicales. 47/4. Roma, 1990, 80p

FEDOROFF, N., 1984. Elementos genéticos transponibles del maíz. Genética molecular. Libros de Investigación y Ciencia. Ed. Prensa Científica. 1987. Barcelona, España, 85 p

FRANCO, P., 1995. Evaluación de la efectividad de la simbiosis entre *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* nativo y tres progenies de la línea experimental de frijol *Phaseolus vulgaris* L 2519. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Diciembre de 1995.

GOLECKI, A, y col., 1998. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of cucurbitaceae. *Planta*, 206: 630-640.

GOODRICH, W. J., R. J. COOKE y A. G. MORGAN, 1985. The application of electrophoresis to the characterization of cultivars of *Vicia faba* L. FABIS- Newsletter (ICARDA) .13: 8- 11.

HACKLER, L.R. y M.H. DICKSON, 1973. A comparison of the amino acid and nitrogen content of pods and seeds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Search Agriculture*. 3 (5) : 1-6.

HSU, H. W., D. L. VAVAK, L.D. SATERLEE y G.A. MILLER, 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Of Food Science*, 42 (5) : 1269- 1273.

HUSSAIN, A., W. BUSHUK, H. RAMIREZ y W. ROCA, 1988. A practical guide for electrophoretic analysis of isoenzymes and proteins in cassava, field beans and forage legumes. CIAT, 56 p

ISHINO, K. y M. ORTEGA, 1975. Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.* 23(3): 529- 533

LANDRY, J. y T. MOUREAUX, 1970. Heterogeneity of the gluteins of the grain of corn. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52: 1021.

LAREO, L. 1992. Fast and reliable one and two dimensional electroforetic parameter for phaseolin type identification. CIAT, Cali, Colombia 1992.

MA, Y. , y F. BLISS, 1978. Seed proteins of common bean. *Crop Science* 18 (3): 431 - 437.

McCOMB, J.A. 1975. Is intergeneric hybridization in the legume possible? *Euphytica* 24: 497-502.

MORENO, G. 1993. Programa básico de investigación sobre nuevas variedades (maíz X frijol) y (frijol X maíz). Documento de trabajo presentado a la Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia. Octubre de 1993.

MORENO, G., 1994. Informe sobre los nuevos cruzamientos de maíz y frijol. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Santafé de Bogotá, Octubre de 1994.

MUÑOZ, G., G. GIRALDO y J. FERNANDEZ DE SOTO, 1993. Descriptores varietales de arroz, frijol, maíz y sorgo. Cali, Colombia CIAT, 174 p

- NIELSEN, S., 1991.** Digestibility of legume proteins. *Food Technology*. 45 (9): 112- 114-, 118.
- NUÑEZ, G. S., 1979.** Cruzamiento artificial en frijol *Phaseolus vulgaris*. Tesis M Sc., Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 84 p.
- OHTA, YASUO, 1991.** Graft-transformation, the mechanism for graft-induced genetic changes in higher plants. *Euphytica* 55: 91-99.
- OPSA, COLOMBIA, 1989.** Ministerio de agricultura. oficina de planeamiento del sector agropecuario. Estudio del caso del cultivo del Fríjol. Bogotá, Serie DA No. 4, 111 p.
- PANIAGUA, C. y A. PINCHINAT, 1976.** Criterios de selección para mejorar el rendimiento de grano en frijol *Phaseolus vulgaris* L. Tesis M. Sc. Escuela para Graduados del CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- PATALAGUA, S Y G. SERNA. 1997.** Análisis bromatológicos de dos muestras experimentales de frijol. arbustivo, (*Phaseolus vulgaris*, L.) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá.
- PENNOCK, W., 1972.** Técnicas para injertar plantas tropicales. Universidad de Puerto Rico. Boletín No. 229. Enero de 1972.
- PLUMMER, D. 1981.** Introducción a la bioquímica practica. Editorial Mc Graw-Hill Latinoamericana S.A Bogotá. Traducción de la segunda edición. 345 p.
- POLIGNANO, G. B., R. SPLENDIDO, P. UGGENIT, 1991.** Protein polymorphism among genotypes of faba bean from afghanistan and ethiopia (*Vicia faba* L). *FABIS-Newsletter (ICARDA)*, 28- 29: 8-11.
- POLIGNANO, G.B., 1982.** Breeding for protein percentage and seed weight in *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Sci. Camb.* 99: 191- 197.
- RAMOS, J., A. RIQUELME y M. PINTO, 1994.** Electrophoretic study of storage proteins of eleven varieties of bean (*Phaseolus vulgaris* L..) *Investig. Agrícola* 14 (1-2):1-8.
- READ, S. M. y D.H. NORTHCOTE, 1983.** Immunological and chemical similarities between the ploem proteins of three genera of the cucurbitaceae. *Planta*, 158: 119-127.
- ROCA, W. y L. MUÑOZ, 1989.** Bean tissue culture: a summary of the state of the art. Unidad de Investigaciones Biotecnológicas, CIAT, Cali, Colombia.
- ROCKLAND, L.B., T. M. RADKE, 1981.** Legume protein quality. *Food Technology*. 35 (3): 79 - 82.
- SEIDL, D. y col., 1969.** Digestibility and inhibitory action of a kidney bean globulin. *Agr. Food Chem.* 17: 1318
- SINGH S. P., R. NODARI y P. GEPTS, 1991.** Genetics diversity in cultivated common bean: 1. ALLOZYMES. *Crop Science* 31 (1) 19 - 23.
- SINGH, S. P. 1988.** Patterns of variation in cultivated common bean , *Economic Botany*,

43 (1), 39-57.

SINGH, S. P., J. A. GUTIERREZ, A. MOLINA, C. URREA y P. GEPTS. Genetic diversity in cultivated common bean: ii. marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crops Science* 31 (1): 23 - 29.

SINGH, S., 1985. Conceptos básicos para el mejoramiento del frijol por hibridación. Programa de Fríjol. CIAT, Cali, Colombia.

SMARTT, J., 1979. Interspecific hybridization in the grain legumes- a review. *Economic Botany* 33(3) :329 - 337.

SMITH, C. A. y E. J. WOOD, 1997. Moléculas biológicas. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. Wilmington, Delaware, EUA., 205 p.

SNELL, FOSTER.1961. Colorimetric methods of analysis. 3^a Edición Van Nostrand Comp. Vol. 3. New Jersey. USA. 498 p.

STOSCHECK, C. 1990. General methods for handling proteins and enzymes. *Methods in Enzymology*. Vol. 182, 1990.

STRYER, LUBERT, 1990. Bioquímica. Editorial Reverté, S.A. Tomo I, 3a Edición.

SUZUKI, D., A. GRIFFITHS, J. MILLER y R. LEWONTIN, 1992. Introducción al análisis genético. Tercera Edición. McGraw-Hill . Interamericana de España, S.A. Madrid, España.

TEMPLE, S. R. y L. SONG, 1980. Crop improvement and genetic resources in *phaseolus vulgaris* for the tropics. In Summerfield R. y Bunting A.H. *Advances in Legume Science*. London , HSMO, pp 365-373.

UNIVERSIDAD DISTRITAL " FRANCISCO JOSE DE CALDAS". 1972 Instituto de Investigaciones y Proyectos Forestales y Madereros. Depto de Tecnología de Maderas. 1972. Estudio comparativo de dos maderas. Informe presentado a Triplex Pizano S.A.. Bogotá, Colombia.

VOYSEST, O., 1983. Variedades de frijol en América latina y su origen. Programa de fríjol. CIAT. Cali, Colombia.

VOYSEST, O., 1985. Mejoramiento del fríjol por introducción y selección. Programa de fríjol, CIAT, Cali, Colombia.

WHITE, J., C. MONTES, y L. Y. MENDOZA, 1992. Use of grafting to characterize and alleviate hybrid dwarfness in common bean. *Euphytica* 59: 19- 25.

ZEE, J. A., A. BOUDREAU, M. BURGEAIS y R. BRETON, 1988. Chemical composition and nutritional quality of faba bean (*Vicia faba*) *J. of Food Science*. 53 (6): 1772 - 1774.

LISTA DE TABLAS

TABLA No. 1. ESTANDARIZACION DE LOS VALORES DE ACUERDO AL PROTOCOLO DE EXTRACCION PARA ELECTROFORESIS NATIVAS.

TABLA No. 2. ESTANDARIZACION DE LOS VALORES DE ACUERDO AL PROTOCOLO DE EXTRACCION PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

TABLA No. 3. RESUMEN DE LOS VALORES PROMEDIOS, DESVIACION ESTANDAR, VALORES MAXIMOS Y MINIMOS DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.

TABLA No. 4. PORCENTAJES DE SIMILITUD DE LAS BANDAS DE PROTEÍNA EXTRAIDAS CON SAL Y CON AGUA EN ELECTROFORESIS NATIVAS DE LAS MUESTRAS DE HARINA.

TABLA No. 5. RANGOS DE MOVILIDAD RELATIVA Y DESVIACION ESTANDAR DE LAS BANDAS DE PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS DE HARINA, EN GELES SDS-PAGE DEL 12%

TABLA No. 6. COMPARACION DE LOS RANGOS DE MOVILIDAD RELATIVA EN GELES SDS-PAGE DEL 12% DE PROTEÍNAS DE LOS PARENTALES Y PROMEDIOS DE LAS PROGENIES DEL FRIJOL 2519 EXTRAIDOS CON PROTOCOLO PARA FRIJOL.

TABLA No. 7. COMPARACION DE LOS RANGOS DE SIMILITUD EN GELES SDS-PAGE DEL 12% DE PROTEÍNAS DE LOS PARENTALES Y PROMEDIOS DE LAS PROGENIES DEL FRIJOL 2519 EXTRAIDOS CON PROTOCOLO PARA FRIJOL

TABLA No. 8. COMPARACION DE LOS RANGOS DE SIMILITUD EN GELES SDS-PAGE DEL 12% DE PROTEÍNAS DE LOS PARENTALES Y PROMEDIOS DE LAS PROGENIES DEL FRIJOL 2519 EXTRAIDOS CON AGUA Y CON SAL, PROTOCOLO PARA MAIZ

TABLA No. 9. VALORES PROMEDIOS DE pH Y DIGESTIBILIDAD "*In vitro*" OBTENIDOS CON ENZIMAS DIGESTIVAS EN HARINAS DE MAIZ Y FRIJOL.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO No. 1. STOCK DE REACTIVOS USADOS PARA PREPARAR GELES SDS- PAGE DE SEGUN LAEMMLI.

ANEXO No. 2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE CAMPO DEL MATERIAL EXPERIMENTAL DE FRIJOL 2519.

ANEXO No. 3. TABLA COMPARATIVA DE PRODUCCION DE SEMILLA Y COSTOS DE PRODUCCION DE LA PROTEÍNA DE LOS FRIJOLES ICA CERINZA Y EXPERIMENTAL 2519

ANEXO No. 4. VALORES DE ABSORBANCIA, CONCENTRACION Y PORCENTAJE DE PROTEÍNA EN LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO.

ANEXO No. 5. PRUEBA DE "t" SOBRE LOS VALORES DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS DE FRIJOL Y MAIZ.

ANEXO No. 6. ANALISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA DE LOS MATERIALES PARENTALES FRIJOL Y MAIZ.

ANEXO No. 7. CURVAS DE CALIBRACION PARA GELES SDS-PAGE CON PROTEÍNAS DE PESO MOLECULAR CONOCIDO USADOS COMO MARCADORES.

ANEXO No. 1.

STOCK DE REACTIVOS PARA PREPARAR GELES DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE, SEGUN LAEMNI

1. Acrilamida / Bisacrilamida (30% T, 2.67 % C).

14.6 gr. acrilamida / 50 ml
0.4 gr. de Bisacrilamida / 50 ml

2. 1.5 M Tris- Hcl, pH 8.8

9.07 gr. tris base / 50 ml

3. 0.5 M Tris Hcl , pH 6.8

3 gr. tris base / 50 ml

4. 10% SDS.

5. SDS Buffer reductor.

Agua desionizada	3.8 ml
0.5 M Tris- Hcl pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10%	1.6 ml
2-mercaptoetanol	0.4 ml
1% Azul de Bromofenol	0.4 ml

6. Buffer de corrida, 5X, pH 8.3 (para 10 corridas).

Tris base	15 gr./ l
Glycina	72 gr./ l
SDS	5 gr./ l

7. Preparación gel de separación, 0.375 M tris, pH 8.8

Gel del 12 %.

Agua desionizada	3.35 ml
1.5 M Tris Hcl, pH 8.8	2.5 ml
SDS, 10%	100 ul
Acrilamida/Bis	4 ml
Persulfato de Amonio,10%	50 ul
TEMED	5 ul

8. Preparación gel de almacenamiento, 0.125 M - tris, pH 6.8, gel del 4.0%.

Agua desionizada	3.0 ml
1.5 M Tris Hcl, pH 8.8	1.25 ml
SDS, 10%	100 ul
Acrilamida/Bis	0.7 ml
Persulfato de Amonio,10%	50 ul
TEMED	10 ul

9. Colorante para teñir los geles de Poliacrilamida.

(Muestra sensibilidad adecuada para detectar microgramos de proteína).

Metanol	40%
Acido Acético	10%
Agua desionizada	50%
Azul de Coomasie	0.1%

10. Decolorante para desteñir geles de Poliacrilamida.

Solución similar a la utilizada para colorear los geles, pero sin la aplicación de Azul de Coomasie.

ANEXO No. 2.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE CAMPO OBTENIDAS EN PRUEBAS EXPERIMENTALES EN CORPOICA DURANTE TRES SEMESTRES DE LOS PARENTALES Y DE LAS PROGENIES DEL FRIJOL 2519.

(*) Moreno, Gerardo, I:A., Depto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

La existencia en Colombia de publicaciones, análisis de laboratorio y estudios preliminares sobre algunas plantas obtenidas en el periodo 1966 a 1981 por JOSE BERNAL RESTREPO, con su metodología denominada **Sistema Químico Biológico, SQB, BERNAL, 1979**, que según él, deja en entredicho lo referente a la forma tradicional de obtener plantas mejoradas, y lo investigado y publicado recientemente sobre las características de los injertos y sus resultados (**OHTA, 1991**), motivaron a la Pontificia Universidad Javeriana a crear un Programa de Investigación, que involucrara a la Facultad de Ciencias, y que implica el desarrollo de actividades de campo y en laboratorio, a partir de un esquema científico, que comenzara con la planeación de todas las actividades a seguir en aras de lograr el estudio de las características que presentaría un tipo de planta que obedeciera a un modelo de injerto SQB, que respondiera a los interrogantes que plantea el uso de la mencionada metodología de trabajo para obtener plantas mejoradas, con el objetivo general de validar o no, lo expuesto por JOSE BERNAL R., desde el año 1966 cuando realizó la primera publicación sobre la planta denominada GRAMALANTE.

Siguiendo lo planeado, se realizó un número suficiente de injertos (172), utilizando la metodología del SQB, (Propiedad de la Pontificia Universidad Javeriana y en proceso de patente), entre el Frijol Arbustivo ***Phaseolus vulgaris*, L.** cultivariedad ICA CERINZA y el Maíz Opaco ***Zea mays* L.** cultivariedad ICA V 557 y se obtuvo suficiente cantidad de plantas y semillas F1 del frijol experimental denominado 2519.

De igual forma se ha continuado con la multiplicación de estas semillas, inicialmente en el invernadero de la Finca San Javier (Vereda el Mortiño, Municipio de Cogua, Departamento de Cundinamarca), propiedad de la Pontificia Universidad Javeriana, durante los semestres 94A, 94 B, 95A, 95B, 96A y 96B. (**CORPOICA, 1996**).

También se han realizado experimentos directamente en el campo, en el

Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias Tibaitatá, propiedad de CORPOICA, situado en el Municipio de Mosquera, Departamento de Cundinamarca, durante los semestres 95A, 96A, 96B, 97A . Se han tomado datos de campo y analizado algunas progenies de las plantas y semillas de los cultivos experimentales que hasta la fecha se han recolectado provenientes cosechas de las 5 generaciones del frijol experimental 2519.(**MORENO, 1994;CORPOICA, 1996; BAHAMON y ROJAS, 1996; FRANCO,1995; CORPOICA, 1997; PATALAGUA y SERNA, 1997**).

Comparando los análisis de los datos sobre número de Plantas en las parcelas experimentales en el campo obtenidos en CORPOICA, durante tres semestres diferentes, **CORPOICA, 1996**, se observa que las plantas de las progenies del frijol experimental 2519, generaciones 1 a 4, **muestran un incremento** promedio sobre los valores obtenidos por la variedad parental, Frijol ICA CERINZA, variedad que fue modificada mediante el uso de la metodología del Sistema Químico Biológico, SQB.:

- El número de plantas emergidas en las parcelas experimentales, años 1995 a 1997, muestran un incremento del 12%. En todos los casos se sembraron 200 semillas por parcela.
- Hay un incremento promedio del 20% en las plantas emergidas y que llegaron a floración, sobre el control frijol ICA CERINZA.
- Con las plantas de frijol que llegaron a la cosecha, se observa un incremento promedio del 29 %. sobre los datos obtenidos para el control ICA CERINZA.

Estos datos corresponden al promedio de 3 experimentos en diferentes semestres de siembra con factores climáticos diferentes, 95A, 96A y 96 B, en los cuales se analizaron los factores de rendimiento, bajo un diseño estadístico de Bloques Completos al Azar, cada uno con 4 repeticiones por parcela experimental de 12 metros cuadrados. Un total de 12 repeticiones en las tres épocas de siembra.

El mayor número de plantas sobrevivientes, de los materiales de frijol en estos tres experimentos, indica que presentan mayor vigor, resistencia y adaptación, al medio ambiente, frente a la variedad de frijol ICA CERINZA utilizada como control.

En lo referente a los **componentes de rendimiento**, se tomaron tres variables por ser los más representativos para esta clase de comparación y análisis y se observa que las progenies de los materiales experimentales 2519 muestran un incremento sobre la variedad Control Frijol ICA CERINZA:

- Se observa un incremento del 11% sobre el promedio obtenido para la

variable Peso de 5 Plantas.

- Hay incremento del 14% sobre el promedio de la variable Peso de 100 semillas.

- Hay un incremento del 28% sobre el promedio de la variable producción por parcela, corregido con el porcentaje de humedad de las semillas al momento de la cosecha.

No se conoce contenido y cualidades de las proteínas **CORPOICA, 1997; PATALAGUA y SERNA, 1997**, presentes en estos materiales experimentales y es prioritario conocerla, cuantificarla y determinar sus parámetros.

- Profesor investigador, Programa de investigación “Características de las plantas Obtenidas con la metodología SQB”.
- Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, 1997.

ANEXO No. 3					
TABLA COMPARATIVA DE PRODUCCION EN SEMILLA Y EN PROTEINA.					
FRIJOL ICA CERINZA vs PROGENIES F1 A F4 DEL FR. EXPERIMENTAL 2519.					
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, OCTUBRE DE 1998.					
PROMEDIOS DE PRODUCCION DE LOS FRIJOLES DURANTE TRES SEMESTRES					
CORPOICA					
	CERINZA	F 1	F 2	F 3	F 4
TIBA, SEM 95 a	1999	2916	2535		
	1378	1650	2315		
	1203	1436	1162		
	1851	2538	2335		
TIBA, SEM 96 a	493	1282	914	809	709
	791	1801	526	591	1308
	922	935	1331	1013	1162
	891	622	1264	937	812
TIBA, SEM 96 b	2327	3370	3239	2726	2472
	1191	2124	2264	1842	1808
	820	1675	1569	612	1333
	957	1875	2452	2252	2164
Producción (gr)	14823,0	22224,0	21906,0	10782,0	11768,0
Promedio (gr)	1235,3	1852,0	1825,5	1347,8	1471,0
Prom/m2 (gr)	102,9	154,3	152,1	112,3	122,6
Prod / ha (Kg)	1029,4	1543,3	1521,3	1123,1	1225,8
diferencia en prod (%)	100,0	149,9	147,8	109,1	119,1
Promedio kg/Ha	1029,4			1353,4	
ESTUDIO ECONOMICO DE LA PROTEINA					
COMPARACION ENTRE ICA CERINZA Y PROMEDIOS FRIJOL 2519					
	ICA CERINZA		PROM Fs	DIFERENCIAS	
prom kg/Ha	1029,4		1353,4	324,0	
Valor prod \$	2058800,0		2706800,0	648000,0	
Costos producción/Ha	1450000,0		1450000,0	0,0	
GANANCIA (\$)	608800,0		1256800,0	648000,0	
% prot muestra	17,90		22,05	4,2	
Producción prot/ha (kg)	184,26		298,42	114,2	
Costo prot/kg-Ha (\$)	7869,20		4858,85	-3010,4	
DIG prom proteína (%)	85,45		85,69	0,2	
Costo prot dig/kg (\$)	9209,13		5670,13	-3539,0	
Valor fríjol /gramo (\$)	1,45		1,45	0,0	
Costo proteína/gr (\$)	7,87		4,86	-3,0	
Costo prot dig/gr (\$)	9,21		5,67	-3,5	
PARTE NUTRICIONAL					
Necesidad prot/día (gr)	70,00		70,00	0,0	
cantidad fríjol/día (gr)	391,06		317,46	-73,6	
Raciones de prot/ha	2632,32		4263,21	1630,9	
Raciones de fríjol/ha	2632,32		4263,21	1630,9	
Raciones /flia-día-Ha	526,46		852,64	326,2	
Costo fríjol /día	567,04		460,32	-106,7	
Costo proteína /día	550,90		340,20	-210,7	
Costo prot digerida /día	644,70		396,90	-247,8	

ANEXO No. 4

**Valores de Absorbancia , Concentración y % Proteína
en muestras de Maíz Opaco, frijol Cerinza y Progenies del Frijol**

Experimental 2519, F1 a F5.

MUESTRA	280 nm	260 nm	conc.(1)	% prot (2)
MAIZ 1	0,778	0,938	0,49	9,86
2	0,654	0,795	0,41	8,19
3	0,668	0,816	0,42	8,30
4	0,964	1,131	0,63	12,69*
5	0,562	0,629	0,39	7,86
6	0,579	0,692	0,37	7,43
7	0,729	0,926	0,43	8,52
8	0,715	0,891	0,43	8,62
9	0,835	0,979	0,55	11,00*
10	0,663	0,836	0,39	7,85
11	0,678	0,812	0,43	8,68
12	0,33	0,388	0,22	4,33*
13	0,705	0,856	0,44	8,84
14	0,513	0,657	0,30	5,92*
15	0,922	1,084	0,61	12,11*
16	0,611	0,74	0,38	7,69
17	0,661	0,833	0,39	7,83
18	0,785	0,963	0,48	9,70
19	0,863	1,08	0,52	10,34
20	0,902	1,114	0,55	11,03*
21	0,595	0,764	0,34	6,83
22	0,689	0,839	0,43	8,61
23	0,654	0,825	0,39	7,73
24	0,917	1,118	0,57	11,43*
25	0,79	0,936	0,51	10,26
26	0,695	0,817	0,46	9,13
27	0,782	0,973	0,47	9,45
28	0,736	0,883	0,47	9,39
29	0,626	0,806	0,36	7,15
30	0,537	0,657	0,33	6,66*
PROM	0,692	0,848	0,43	8,56
DSTAN	0,076	0,099	0,05	0,98
C.VAR	10,986	11,728	11,63	11,51
MAX	0,863	1,080	0,52	10,34
MIN	0,562	0,629	0,34	6,83
CERINZA	280 nm	260 nm	conc.	% prot
1	0,805	0,938	0,535	16,05
2	0,845	0,999	0,551	16,52
3	0,845	0,981	0,564	16,93
4	0,793	0,931	0,522	15,65
5	1,01	1,185	0,665	19,95
6	0,877	1,029	0,577	17,32
7	0,815	0,987	0,513	15,39
8	1,068	1,25	0,705	21,16
9	1,026	1,198	0,680	20,39
10	1,216	1,391	0,828	24,83*
11	0,881	1,043	0,573	17,19
12	1,123	1,252	0,789	23,67*
13	0,924	1,056	0,630	18,89
14	1,052	1,196	0,722	21,65*
15	0,891	1,036	0,594	17,81

MUESTRA	280 nm	260 nm	conc.(1)	% prot (2)
16	0,95	1,119	0,622	18,66
17	0,86	0,973	0,594	17,81
18	0,906	1,036	0,617	18,51
19	0,518	0,617	0,334	10.02*
20	1,016	1,183	0,676	20,27
21	0,814	0,96	0,532	15,96
22	0,75	0,912	0,469	14.08*
23	0,612	0,756	0,374	11.22*
24	0,983	1,165	0,638	19,15
25	1,121	1,276	0,768	23.03*
26	0,841	0,992	0,550	16,49
27	0,696	0,807	0,465	13.96*
28	0,929	1,111	0,596	17,87
29	0,738	0,879	0,476	14.28*
30	1,089	1,237	0,748	22.45*
PROM	0,900	1,050	0,597	17,90
DSTAN	0,156	0,168	0,115	1,69
C.VAR	17,318	16,033	19,311	9,46
MAX	1,216	1,391	0,828	21,16
MIN	0,518	0,617	0,334	15,39
FRIJOL F1	280 nm	260 nm	conc.	% prot
101	0,797	0,893	0,557	16.70*
102	1,233	1,378	0,864	25.92*
103	1,387	1,524	0,992	29.75*
104	1,179	1,316	0,827	24.82*
105	0,988	1,166	0,645	19,36
106	1,037	1,147	0,736	22,07
107	0,909	1,024	0,631	18,92
108	1,038	1,161	0,727	21,80
109	0,961	1,079	0,670	20,09
110	0,762	0,901	0,496	14.89*
111	1,17	1,334	0,800	23,99
112	1,036	1,206	0,689	20,68
113	1,065	1,178	0,755	22,66
114	1,114	1,265	0,765	22,96
115	0,915	1,035	0,632	18,95
116	1,179	1,335	0,813	24.39*
117	1,03	1,156	0,718	21,54
118	0,996	1,093	0,713	21,39
119	1,018	1,141	0,711	21,32
120	1,136	1,31	0,765	22,96
121	0,917	1,053	0,621	18,63
122	0,954	1,108	0,637	19,10
123	0,977	1,097	0,681	20,42
124	1,145	1,306	0,782	23,47
125	0,838	0,979	0,555	16.65*
126	1,01	1,114	0,719	21,57
127	1,023	1,172	0,695	20,85
128	0,729	0,845	0,488	14.63*
129	1,05	1,194	0,720	21,60
130	1,084	1,216	0,756	22,68
PROM	1,023	1,158	0,705	21,23
DSTAN	0,141	0,151	0,106	1,57
C.VAR	13,810	13,064	15,058	7,41
MAX	1,387	1,524	0,992	23,99
MIN	0,729	0,845	0,488	18,63
FRIJOL F2	280 nm	260 nm	conc.	% prot
201	1,039	1,197	0,701	21,02

MUESTRA	280 nm	260 nm	conc.(1)	% prot (2)
202	1,032	1,153	0,723	21,70
203	0,955	1,064	0,672	20.15*
204	1,091	1,252	0,740	22,19
205	1,154	1,3	0,801	24,02
206	1,109	1,241	0,776	23,27
207	1,151	1,274	0,816	24,47
208	1,107	1,253	0,764	22,91
209	1,198	1,335	0,842	25,27
210	1,131	1,28	0,780	23,41
211	0,986	1,13	0,670	20.09*
212	1,063	1,211	0,727	21,82
213	1,171	1,323	0,810	24,29
214	0,968	1,094	0,669	20.07*
215	1,315	1,467	0,923	27.70*
216	0,975	1,094	0,680	20,39
217	1,281	1,389	0,930	27.90*
218	1,096	1,198	0,788	23,65
219	0,947	1,081	0,646	19.39*
220	0,96	1,091	0,659	19.77*
221	0,932	1,072	0,630	18.90*
222	1,019	1,148	0,707	21,21
223	1,021	1,142	0,715	21,44
224	1,225	1,367	0,860	25.80*
225	1,307	1,447	0,926	27.78*
226	1,087	1,202	0,771	23,14
227	1,232	1,35	0,884	26.51*
228	1,037	1,184	0,708	21,23
229	0,978	1,083	0,693	20,78
230	1,308	1,47	0,910	27.31*
PROM	1,096	1,230	0,764	22,57
DSTAN	0,117	0,123	0,090	1,45
C.VAR	10,701	9,992	11,793	6,40
MAX	1,315	1,470	0,930	25,27
MIN	0,932	1,064	0,630	20,39
FRIJOL F3	280 nm	260 nm	conc.	% prot
301	1,134	1,283	0,783	23,48
302	1,025	1,153	0,712	21,37
303	1,136	1,294	0,777	23,32
304	1,067	1,203	0,740	22,19
305	0,826	0,927	0,576	17.27*
306	1,022	1,191	0,679	20,37
307	1,109	1,245	0,773	23,18
308	1,012	1,16	0,687	20,61
309	1,336	1,516	0,919	27.56*
310	0,92	1,022	0,649	19.48*
311	0,991	1,11	0,692	20,77
312	0,986	1,109	0,685	20,56
313	1,013	1,103	0,732	21,96
314	0,774	0,848	0,555	16.66*
315	1,091	1,239	0,749	22,48
316	1,288	1,475	0,875	26.26*
317	1,465	1,633	1,030	30.89*
318	1,007	1,12	0,710	21,29
319	1,149	1,308	0,787	23,61
320	1,274	1,409	0,904	27.12*
321	1,084	1,232	0,744	22,32
322	1,074	1,177	0,770	23,11
323	1,236	1,38	0,867	26.01*
324	1,008	1,138	0,698	20,93
325	1,127	1,207	0,830	24,89

MUESTRA	280 nm	260 nm	conc.(1)	% prot (2)	
326	1,331	1,501	0,922	27.67*	
327	1,038	1,195	0,701	21,02	
328	1,042	1,201	0,702	21,07	
329	1,018	1,14	0,712	21,35	
330	1,1	1,294	0,722	21,65	
PROM	1,089	1,227	0,756	22,00	
DSTAN	0,147	0,168	0,103	1,23	
C.VAR	13,502	13,726	13,608	5,61	
MAX	1,465	1,633	1,030	24,89	
MIN	0,774	0,848	0,555	20,37	
FRIJOL F4	280 nm	260 nm	conc.	% prot	
401	0,992	1,166	0,651	19,54	
402	0,87	1,019	0,574	17.22*	
403	1,016	1,186	0,673	20,20	
404	1,121	1,3	0,750	22,49	
405	1,278	1,522	0,824	24,73	
406	1,297	1,505	0,867	26,00	
407	0,98	1,15	0,645	19,35	
408	1,17	1,354	0,784	23,53	
409	0,903	1,12	0,548	16.45*	
410	1,26	1,504	0,810	24,30	
411	0,761	0,93	0,473	14.18*	
412	0,781	0,952	0,487	14.61*	
413	1,356	1,583	0,899	26.96*	
414	1,19	1,391	0,787	23,62	
415	0,851	1,079	0,499	14.97*	
416	1,293	1,487	0,874	26.22*	
417	1,38	1,572	0,944	28.33*	
418	1,426	1,602	0,993	29.78*	
419	1,327	1,584	0,853	25,59	
420	1,012	1,171	0,679	20,36	
421	0,827	0,999	0,523	15.68*	
422	0,822	0,972	0,535	16.06*	
423	0,98	1,151	0,644	19,33	
424	1,142	1,351	0,743	22,30	
425	1,171	1,363	0,779	23,38	
426	1,162	1,3	0,813	24,39	
427	1,32	1,531	0,882	26.47*	
428	1,1	1,282	0,731	21,92	
429	0,972	1,135	0,644	19,32	
430	1,13	1,298	0,765	22,95	
PROM	1,096	1,285	0,722	22,41	
DSTAN	0,195	0,211	0,144	2,25	
C.VAR	17,780	16,439	19,956	10,02	
MAX	1,426	1,602	0,993	26,00	
MIN	0,761	0,930	0,473	19,32	
FRIJOL F5	280 nm	260 nm	conc.	% prot	
501	1,437	1,64	0,981	29.43*	
502	0,828	0,986	0,534	16.02*	
503	0,847	1,013	0,543	16.29*	
504	1,15	1,344	0,761	22,83	
505	1,136	1,321	0,757	22,71	
506	0,944	1,093	0,633	18,98	
507	0,977	1,158	0,634	19,03	
508	0,994	1,193	0,634	19,02	
509	0,858	0,988	0,579	17.37*	
510	0,969	1,174	0,610	18,29	
511	0,917	1,104	0,582	17.47*	

MUESTRA	280 nm	260 nm	conc.(1)	% prot (2)	
512	1,019	1,175	0,686	20,59	
513	1,185	1,334	0,823	24,69	
514	0,888	1,062	0,569	17.08*	
515	1,111	1,301	0,733	22,00	
516	1,147	1,346	0,755	22,65	
517	0,968	1,124	0,646	19,38	
518	1,215	1,432	0,795	23,85	
519	1,145	1,341	0,756	22,67	
520	1,185	1,36	0,803	24,09	
521	1,295	1,525	0,848	25.45*	
522	1,394	1,584	0,957	28.71*	
523	1,231	1,416	0,832	24,96	
524	0,826	0,963	0,548	16.45*	
525	1,204	1,375	0,821	24,64	
526	1,038	1,212	0,688	20,63	
527	1,161	1,364	0,763	22,89	
529	1,164	1,387	0,750	22,50	
530	1,213	1,398	0,818	24,53	
PROM	1,084	1,266	0,719	22,05	
DSTAN	0,165	0,181	0,120	2,19	
C.VAR	15,204	14,269	16,706	9,95	
MAX	1,437	1,640	0,981	24,96	
MIN	0,826	0,963	0,534	18,29	
(1) Ecuación de STOSCHECK :Prot(mg/mL)=1.55A280 - 0.76A260					
(2) % Prot = Concentrac. X Factor de dilución.					
Muestras de porcentaje de proteína señalados con asterisco (*)					
fueron eliminadas de acuerdo al criterio de CHAUVENET, por tanto					
no fueron tomadas en cuenta para cálculos o análisis estadístico.					

ANEXO No. 5

Prueba de " t " para porcentajes de Proteína en muestras de harina de frijól ICA Cerinza y progenies										
Frijol Experimental 2519, F1 a F 5.										
CERINZA VS FRIJOL 2519	CERINZA	F1	CERINZA	F2	CERINZA	F3	CERINZA	F4	CERINZA	F5
Media	17,898	21,227	17,898	22,567	17,898	21,977	17,898	22,405	17,898	22,046
Varianza	2,865	2,471	2,865	2,088	2,865	1,520	2,865	5,044	2,865	4,814
Observaciones	20	22	20	18	20	21	20	18	20	20
Dif. hipotética de las medias	0		0		0		0		0	
Grados de libertad	39		36		35		31		36	
Estadístico t	-6,586		-9,172		-8,784		-6,927		-6,695	
P(T<=t) una cola	4,E-08		3,E-11		1,E-10		5,E-08		4,E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,685		1,688		1,690		1,696		1,688	
P(T<=t) dos colas	8,E-08		6,E-11		2,E-10		9,E-08		8,E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2,023		2,028		2,030		2,040		2,028	
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales . Significancia al 0.01										

ANEXO No. 6

**Análisis de Varianza para porcentajes de Proteína en muestras de harina,
de frijol ICA CERINZA y Progenies de Frijol Experimental 2519.**

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	6	122,2788	20,380	7,3107
2	6	124,5663	20,761	5,0169
3	6	122,8158	20,469	6,4663
4	6	127,4051	21,234	11,4504
5	6	128,6911	21,449	7,0382
6	6	126,6072	21,101	9,8637
7	6	123,7156	20,619	8,2074
8	6	138,8538	23,142	3,6017
9	6	132,9434	22,157	2,0033
10	6	128,1474	21,358	8,6697
11	6	126,9408	21,157	4,1239
12	6	124,0632	20,677	4,2122
13	6	132,2076	22,035	3,4865
14	6	131,7563	21,959	5,0999
15	6	131,0343	21,839	7,8771
16	6	129,9921	21,665	4,0284
17	6	122,4462	20,408	8,3430
18	6	130,2568	21,709	2,7810
19	4	81,6273	20,407	7,1750
20	4	84,5908	21,148	7,4426
21	2	43,2486	21,624	0,0010
22	1	22,6812	22,681	0,0000
CERINZA	20	357,951	17,898	2,8645
F1	22	466,9897	21,227	2,4714
F2	18	406,2066	22,567	2,0876
F3	21	461,5092	21,977	1,5203
F4	18	403,2936	22,405	5,0445
F5	20	440,9196	22,046	4,8138

ANÁLISIS DE VARIANZA

VARIACION	S.C.	G.L.	PROM C.	F	PROBABIL	Fc 0.01
Entre grupos	303,2388	5	60,6478	19,6121	5,0376E-14	3,1835
Dentro grupo	349,4367	113	3,0924			
Total	652,6755	118				

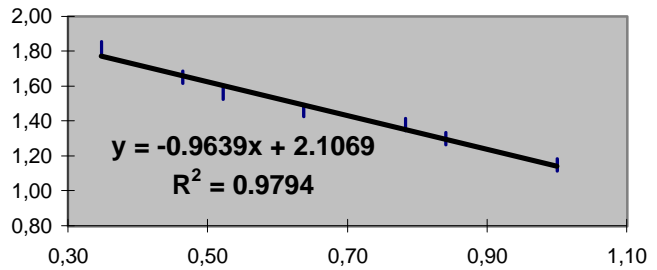
Análisis de varianza de un factor. Significancia al 0.01.

ANEXO No. 7

COMPARACION DE LAS POSICIONES DE LAS BANDAS DE PROTEÍNAS Y DETERMINACION DE CURVAS DE CALIBRACION PARA GELES SDS-PAGE 12% PARENTALES Y PROGENIES EXPERIMENTALES DEL FRIJOL 2519.

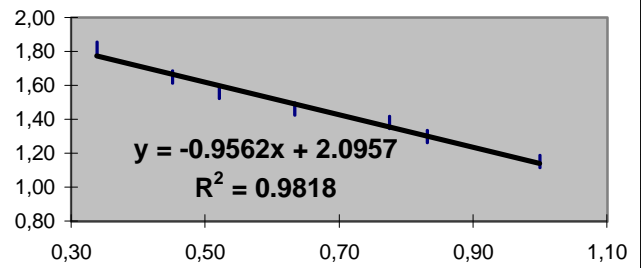
GEL 1 Y GEL 7

POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,4	3,48	0,35	1,82	1,772	59,1
3,2	4,64	0,46	1,65	1,66	45,7
3,6	5,22	0,52	1,56	1,604	40,2
4,4	6,38	0,64	1,46	1,492	31,1
5,4	7,83	0,78	1,38	1,353	22,5
5,8	8,41	0,84	1,30	1,297	19,8
6,9	10,00	1,00	1,15	1,143	13,9



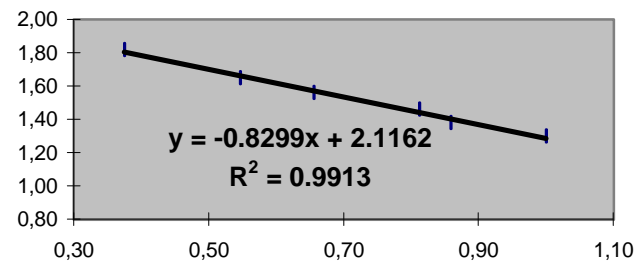
GEL 2

POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,4	3,38	0,34	1,82	1,772	59,2
3,2	4,51	0,45	1,65	1,665	46,2
3,7	5,21	0,52	1,56	1,597	39,6
4,5	6,34	0,63	1,46	1,49	30,9
5,5	7,75	0,77	1,38	1,355	22,6
5,9	8,31	0,83	1,30	1,301	20
7,1	10,00	1,00	1,15	1,14	13,8



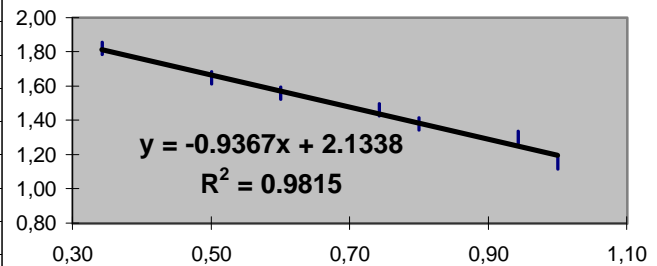
gel 8

POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,4	3,75	0,38	1,82	1,805	63,8
3,5	5,47	0,55	1,65	1,662	46
4,2	6,56	0,66	1,56	1,572	37,3
5,2	8,13	0,81	1,46	1,442	27,7
5,5	8,59	0,86	1,38	1,403	25,3
6,4	10,00	1,00	1,30	1,286	19,3

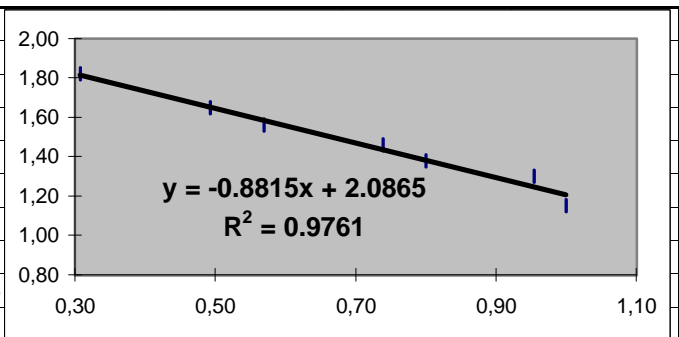


gel 11

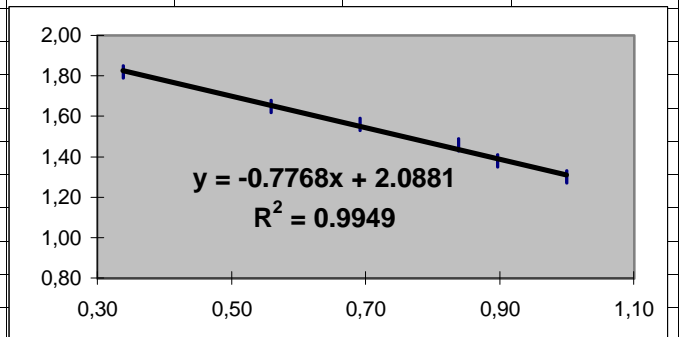
POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,4	3,43	0,34	1,82	1,813	65
3,5	5,00	0,50	1,65	1,665	46,3
4,2	6,00	0,60	1,56	1,572	37,3
5,2	7,43	0,74	1,46	1,438	27,4
5,6	8,00	0,80	1,38	1,384	24,2
6,6	9,43	0,94	1,30	1,251	17,8
7	10,00	1,00	1,15	1,197	15,7



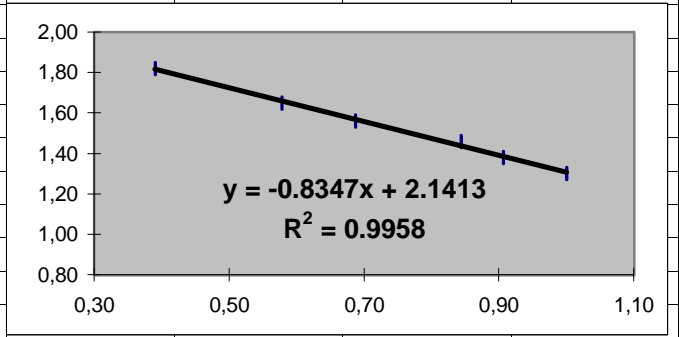
gel 12					
POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2	3,08	0,31	1,82	1,815	65,4
3,2	4,92	0,49	1,65	1,653	44,9
3,7	5,69	0,57	1,56	1,585	38,4
4,8	7,38	0,74	1,46	1,436	27,3
5,2	8,00	0,80	1,38	1,381	24,1
6,2	9,54	0,95	1,30	1,246	17,6
6,5	10,00	1,00	1,15	1,205	16



gel 15					
POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,3	3,38	0,34	1,82	1,825	66,9
3,8	5,59	0,56	1,65	1,654	45,1
4,7	6,91	0,69	1,56	1,551	35,6
5,7	8,38	0,84	1,46	1,437	27,4
6,1	8,97	0,90	1,38	1,391	24,6
6,8	10,00	1,00	1,30	1,311	20,5



geles 16, 4, 5, 6 y 10					
POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,5	3,91	0,39	1,82	1,815	65,3
3,7	5,78	0,58	1,65	1,659	45,6
4,4	6,88	0,69	1,56	1,567	36,9
5,4	8,44	0,84	1,46	1,437	27,4
5,8	9,06	0,91	1,38	1,385	24,3
6,4	10,00	1,00	1,30	1,307	20,3



gel 14					
POS	POSc	MR	LOG	Y	PMc
2,3	2,95	0,29	1,82	1,797	62,6
3,5	4,49	0,45	1,65	1,668	46,6
4,3	5,51	0,55	1,56	1,583	38,3
5,6	7,18	0,72	1,46	1,444	27,8
6,1	7,82	0,78	1,38	1,39	24,6
7,6	9,74	0,97	1,30	1,23	17
7,8	10,00	1,00	1,15	1,208	16,2

