

## DESARROLLO DE LINEAS DE FRIJOL RESISTENTES AL GORGOJO *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)

Carmen Elisa Posso<sup>1</sup>  
César Cardona  
José F. Valor  
Héctor Morales

### RESUMEN

Cuatro variantes electroforéticas de la proteína arcelina, factor antibiótico de resistencia al gorgojo pintado del frijol, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae), fueron transferidos de frijoles silvestres a frijoles cultivados mediante un sistema de retrocruzas. Con este sistema, basado en la combinación de selección mediante un marcador molecular (arcelina) y pruebas de alimentación con el insecto, se desarrollaron líneas avanzadas de frijol, codificadas RAZ, que presentan altos niveles de resistencia al gorgojo y excelentes condiciones agronómicas, comerciales y de calidad proteínica. Las líneas derivadas de cruzas con arcelina 1 presentaron niveles de resistencia similares o superiores a los del testigo resistente; se detectaron niveles intermedios de resistencia en progenies con arcelina 2, mientras que las líneas derivadas de cruzas con arcelina 3 y 4 resultaron susceptibles. Las líneas RAZ con arcelina 1 y 2, resistentes al gorgojo del frijol, serán distribuidas a los programas nacionales de investigación en países de América Latina y África, donde *Z. subfasciatus* constituye una plaga importante del frijol almacenado, con el fin de brindar al agricultor una alternativa de control para esta plaga.

### SUMMARY

By means of a backcross breeding program, high levels of resistance to the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae), were transferred from wild bean accessions to bean cultivars. Four variants of arcelin, the antibiosis factor, showed differential effects on the biology of the insect. Thus, arcelin 1-derived lines were highly resistant to the weevil with a level of resistance equal to that of the resistant check. Arcelin 2 lines were intermediate, while lines obtained

from crosses with arcelin 3 and 4 were susceptible. Resistant lines were coded RAZ and will be distributed to national programs in Africa and Latin America where the Mexican bean weevil is an important storage pest.

### INTRODUCCION

Se han detectado niveles de resistencia por antibiosis a los gorgojos del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) y *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) en genotipos silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Schoonhoven et al. 1983). El efecto antibiótico sobre estos bruchidos se manifiesta en una reducción significativa de la emergencia de adultos en los materiales resistentes; alta mortalidad de los primeros instares larvales tardíos y segundos instares tempranos; prolongación sustancial de los días a emergencia de los insectos que sobreviven y reducción del peso y fecundidad de las progenies, siendo los factores responsables de esta resistencia de naturaleza química y presentes en los cotiledones de la semilla (Cardona et al. 1989).

Arcelina, una proteína nueva, ha sido reportada como el factor responsable de la resistencia a *Z. subfasciatus* en genotipos silvestres de *P. vulgaris* (CIAT 1988; Osborn et al. 1988). Esta proteína presenta cinco variantes electroforéticas designadas como arcelina 1, 2, 3, 4, (Osborn et al. 1986) y arcelina 5 (Lioi y Bollini 1989), se hereda como un gen simple, su presencia es dominante a su ausencia (Romero Andreas et al. 1986) y se puede detectar mediante técnicas electroforéticas y serológicas (Fig. 1 y 2).

La caracterización del efecto de arcelina

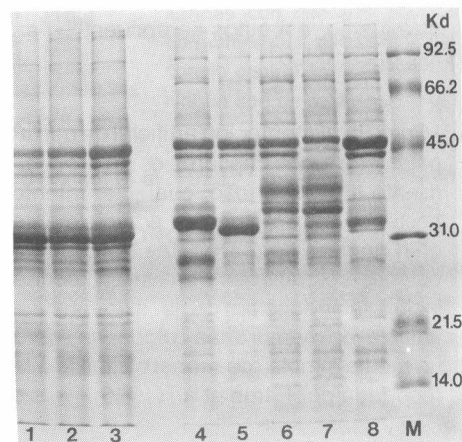


Figura 1. Electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) de cinco variantes de arcelina. Líneas 1-3: G 02771 arcelina 5; 4: G 12882 arcelina 1; 5: G 12866 arcelina 2; 6: G 12922 arcelina 3; 7: G 12949 arcelina 4; 8: Pijao; M: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda de arcelina 5.

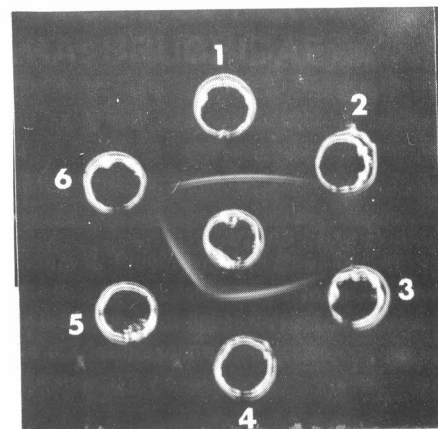


Figura 2. Prueba serológica de Ouchterlony que detecta la presencia de arcelina, utilizada en la obtención de líneas de frijol con resistencia a *Z. subfasciatus*. Reacción positiva en muestras 1, 4 y 5.

1. Programa de Entomología de Frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia.

sobre **Z. subfasciatus** y el conocimiento genético de su herencia, generaron las bases de un programa de mejoramiento para la obtención de frijoles cultivados con resistencia a esta plaga, el cual se basa en un sistema de retrocruzas y ciclos de selección por la presencia de la proteína, seguidas por pruebas replicadas de alimentación con el insecto (Harmsen et al. 1988; Cardona y Kornegay 1989; Harmsen 1989).

Mediante retrocruzas se han desarrollado en el CIAT cientos de líneas de frijol a partir de cuatro de las variantes electroforéticas de arcelina, con niveles variables de resistencia al insecto. El presente trabajo describe el sistema que se ha desarrollado en el CIAT para la obtención de líneas de frijol resistentes a **Z. subfasciatus**.

## MATERIALES Y METODOS

### Cria masal del insecto y Evaluaciones de Resistencia

Para las evaluaciones de resistencia de materiales silvestres y líneas mejoradas por resistencia a **Z. subfasciatus** se emplearon insectos provenientes de las colonias de cría del laboratorio de Entomología de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Se siguieron las técnicas descritas por Schoonhoven y Cardona (1982) y por Cardona et al. (1989). Se trabajó bajo condiciones ambientales controladas de T=28°C y H.R.=80%. En la mayoría de los casos se infestaron cuatro ó cinco repeticiones de 50 semillas con siete parejas del insecto, randomizadas en un diseño de bloques completos al azar.

Se registraron las siguientes variables: días a emergencia de los adultos, porcentaje de emergencia y porcentaje de semillas con daño 55 días después de la infestación. Los datos se sometieron a análisis de varianza, previa transformación de los porcentajes a arco seno  $x$ . Cuando la prueba de F fue significativa, los promedios se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan (SAS Institute 1985).

Para comparar entre tratamientos y discriminar los niveles de resistencia de los genotipos y líneas de frijol evaluadas, se utilizó el siguiente índice de susceptibili-

dad (Is) (Dobie 1974), cuyos valores no fueron analizados estadísticamente:

$$Is = \frac{\log n (\text{progenie/hembra})}{\text{días a emergencia}} \times 100$$

### Técnicas para detectar la proteína

La presencia de arcelina y la identificación de sus cinco variantes se hizo por medio de electroforesis de una dimensión en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (1970) modificado por Ma y Bliss (1978), utilizando un equipo Hoeffer Scientific Instrument. La relación arcelina/faseolina se estimó mediante un densitómetro laser ultrascan XL (LKB-Bromma).

La arcelina también se detectó por medio de la prueba serológica de inmunodifusión (Ouchterlony 1968) según el método descrito por Garvey et al. (1977). Para la prueba serológica se utilizaron 5  $\mu$ l de cada muestra (15 mg de harina de cada semilla en 200  $\mu$ l del buffer 0,5M NaCl; pH 3,2, suspendida a temperatura ambiente durante 30 minutos) y 5  $\mu$ l del anticuerpo de arcelina 1 ó arcelina 4 para detectar arcelina 1,3 y 4 ó el anticuerpo de arcelina 1 para detectar arcelina 2. Los anticuerpos se obtuvieron en la Universidad de Wisconsin y en la Unidad de Virología del CIAT a partir de la inoculación en conejos blancos New Zealand de arcelinas 1 y 4 puras, para lo cual se hizo una serie de cuatro inyecciones intramusculares a intervalos semanales, inoculando en cada inyección 0,5 ml del antígeno emulsificado en un volumen igual, completo ó incompleto de adyuvante de Freund.

### Metodo de mejoramiento

Debido a que arcelina se hereda como un gen simple dominante (Romero Andreas et al. 1986), se desarrolló el esquema de mejoramiento por el sistema de retrocruzas descrito en la Fig. 3, con el fin de transferir la resistencia de frijoles silvestres a cultivares comerciales. Como padres donantes de resistencia se emplearon los genotipos silvestres G 12882, G 12866, G 12922 y G 12952, seleccionados y purificados por electroforesis por la presencia de arcelina 1,2,3 ó 4, respectivamente. También se utilizaron dos líneas retrocruzadas a frijol Pinto y una línea retrocruzada a la variedad Sanilac obtenidas por Harmsen et al. (1989).

Como padres cultivados se utilizaron frijoles comerciales susceptibles a **Z. subfasciatus**. Por ser tan reciente su descubrimiento (CIAT 1988; Lioi y Bollini 1989), la arcelina 5 no se ha empleado aún en bloques de cruas.

El proceso mostrado en la Figura 3 consistió en seleccionar por la presencia de arcelina, semillas  $F_1$  de primeras retrocruzas y semillas  $F_1$  y  $F_2$  de segundas retrocruzas mediante la prueba serológica de Ouchterlony, seleccionando para la siembra en cada generación las semillas positivas y descartando las negativas. En la  $F_2$  de segundas retrocruzas se sembraron solamente las semillas positivas homocigotas dominantes para la presencia de arcelina; tanto en  $F_1$  como en  $F_2$  de segundas retrocruzas se hicieron selecciones agronómicas en campo. Las progenies  $F_3$  así obtenidas se sometieron al insecto en pruebas replicadas, seleccionando para la siembra las progenies resistentes. Las líneas  $F_4$  también fueron probadas con el insecto en pruebas replicadas y aquellas que resultaron resistentes se codificaron como líneas RAZ.

La ventaja de este sistema de retrocruzas radicó en que al cabo de dos ó tres generaciones se pudo incorporar el gen de la proteína, conservando las características deseables comerciales del genotipo susceptible utilizado como padre recurrente.

### Materiales vegetales

Cinco genotipos silvestres: G 12882, G 12866, G 12922, G 12952 y G 02771, de reacción conocida al insecto (Cardona et al. 1989), se seleccionaron mediante electroforesis por la presencia de las variantes 1,2,3,4 y 5 de arcelina, respectivamente (Fig. 1); las semillas positivas para la presencia de cada variante se multiplicaron bajo condiciones de invernadero (T=28°C; R.H.=75-85%) y se cosecharon en forma masal. Posteriormente se evaluaron por resistencia al insecto y se compararon con el testigo comercial, Calima, en una serie de cuatro experimentos de cinco repeticiones por experimento, según la metodología de evaluación descrita anteriormente.

También se probaron por resistencia al insecto las generaciones  $F_3$  y  $F_4$  de 118

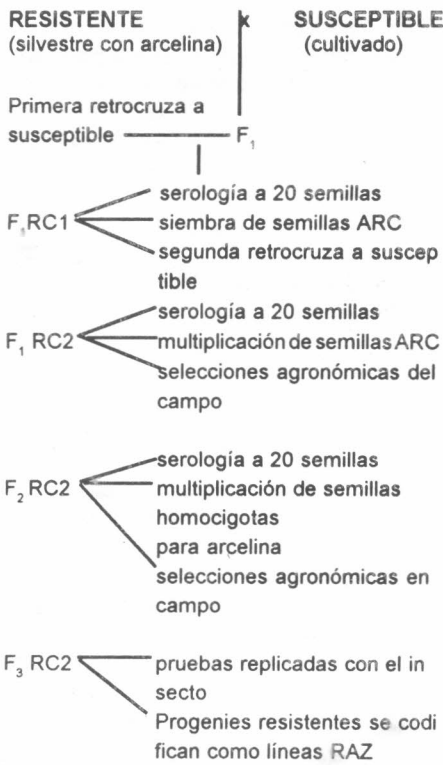


Figura 3. Esquema de mejoramiento para la obtención de líneas de frijol con resistencia a *Z. subfasciatus*.

líneas mejoradas obtenidas con las diferentes variantes de arcelina por el sistema de mejoramiento descrito. En cada ocasión, las líneas se probaron en tres ó cuatro repeticiones de 50 semillas infestadas con siete parejas por repetición. Se emplearon como testigos el genotipo silvestre G 12952 (resistente) y la variedad Pijao (susceptible). Se hizo el análisis combinado de varianza con cada una de las variantes de arcelina.

Las diez mejores líneas RAZ, derivadas de cruces con arcelina 1, se evaluaron en tres y cuatro repeticiones durante cuatro generaciones consecutivas para registrar, además del porcentaje de emergencia de *Z. subfasciatus* y los días a emergencia de adultos, el porcentaje de semillas dañadas 55 días después de la infestación. Para evaluar sus características agronómicas, las diez líneas fueron sembradas en lotes experimentales del CIAT (T=24°C; H.R.=80%) durante tres semestres consecutivos (88A-89A-89B) con el fin de registrar el color y tamaño de la semilla, los hábitos de crecimiento, los días a floración y los rendimientos. Como

testigo comercial se sembró la variedad Pijao.

**Determinación de calidad culinaria**

Para evaluar la calidad culinaria de las 10 líneas RAZ mencionadas y el correspondiente testigo comercial, se determinó el tiempo de cocción medio en un cocinador Mattson modificado. Este método requirió 25 semillas de cada línea RAZ y el tiempo medio de cocción se determinó como aquel en el que las agujas del cocinador penetraron el 50% de los granos probados.

**RESULTADOS Y DISCUSION**

**Evaluación de cinco variantes Electroforeticas de Arcelina en Genotipos Silvestres de P. vulgaris**

En la evaluación de cinco genotipos silvestres purificados por la presencia de cada variante electroforética de arcelina (Fig. 1) se obtuvo que estos genotipos fueron resistentes en comparación con el testigo susceptible Calima, pero con efectos diferentes de cada variante en la biología de *Z. subfasciatus* (Tabla 1). El genotipo G 02771 (arcelina 5) confirió el más alto nivel de resistencia, expresado por el menor porcentaje emergencia y el mayor número de días a emergencia de adultos, respecto a las otras variantes, con un índice de susceptibilidad negativo (-0,3) que implica la incapacidad de las colonias de *Z. subfasciatus* de sobrevivir en este material. De acuerdo con este índice, el genotipo G 12952 (arcelina 4) también presentó altos niveles de resistencia, seguida por G 12882 (arcelina 1) y G 12866 (arcelina 2). La variante arcelina 3, presente en el genotipo G 12922, confirió el más bajo nivel de resistencia al insecto, pues presentó el más alto porcentaje de emergencia y el menor número de días a emergencia (Tabla 1).

**Evaluación de Líneas de Frijol derivadas de cuatro variantes Electroforeticas de Arcelina**

El análisis combinado de varianza para las líneas con arcelina 1,2,3,4 mostró diferencias significativas entre las fuentes de resistencia (Tabla 2), ya que las líneas avanzadas derivadas de arcelina 1 resultaron altamente resistentes a *Z. subfasciatus* al reducir drásticamente la

emergencia de adultos y prolongar significativamente los días a emergencia en comparación con el testigo susceptible. Las líneas obtenidas de cruces con el genotipo de la variante arcelina 2 fueron significativamente inferiores al testigo resistente respecto a los parámetros evaluados, pero también resultaron resistentes en comparación con Pijao. De acuerdo con el índice de susceptibilidad, arcelina 1 confiere altos niveles de resistencia y arcelina 2 niveles intermedios.

Las líneas con arcelina 3 (Tabla 2) fueron susceptibles a *Z. subfasciatus* y presentaron valores muy similares a los del testigo susceptible, razón por la cual esta variante fue descartada para propósitos de mejoramiento. Sorpresivamente, la variante arcelina 4 no dio los niveles de resistencia que se esperaban de ella, ya que 25 líneas seleccionadas a partir de esta variante resultaron susceptibles a *Z. subfasciatus*, aún cuando al comparar los días a emergencia de adultos de estas líneas se registró una ligera prolongación significativa respecto al testigo susceptible. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Harmsen (1989), quien tampoco obtuvo niveles de resistencia en líneas derivadas de arcelina 4.

Para tratar de explicar las razones por las cuales se pierden los niveles de resistencia presentes en la arcelina 4 (Tabla 1) y debido a que existe respuesta significativa a la dosis de arcelina (Osborn et al. 1988; Cardona et al. 1989), se estudió la posibilidad de que concentraciones bajas de la proteína en estas líneas fueran la causa de los bajos niveles de resistencia al insecto. Para ello, se gráfico la relación arcelina/faseolina de cada línea con arcelina 4 y del respectivo padre silvestre, contra los valores del índice de susceptibilidad. Se encontró que todas las líneas con arcelina 4 mostraron bajas concentraciones de la proteína y altos niveles de susceptibilidad a diferencia del padre, el cual mostró valores altos de arcelina y baja susceptibilidad al insecto. Actualmente, se está estudiando la estructura molecular de las variantes de arcelina para tratar de explicar por qué la concentración de la proteína disminuye en las progenies con arcelina 4, expresándose en niveles de susceptibilidad. Tal como lo demostraron Osborn et al (1986), las variantes 1,2 y 3 no presentan polipéptidos comunes, mientras que las variantes 3 y

4 parecen tener similitud estructural, lo cual podría ser una explicación para la ineffectividad de los padres que contienen arcelina 4.

Según el análisis combinado (Tabla 2), los más altos niveles de resistencia a *Z. subfasciatus* se obtuvieron a partir de padres con arcelina 1; padres con arcelina 2 confirieron niveles intermedios de resistencia y padres con arcelina 3 y 4 mostraron susceptibilidad.

### Evaluación intensiva de Líneas de Frijol con Arcelina 1

Debido a que los más altos niveles de resistencia a *Z. subfasciatus* se obtuvieron de líneas derivadas con arcelina 1, se desarrollaron numerosas líneas avanzadas a partir de esta variante. En la Tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación entomológica de las diez mejores líneas seleccionadas, codificadas RAZ. Todas presentaron porcentajes de emer-

gencia iguales al testigo resistente G 12952 y prolongaron significativamente los días a emergencia del insecto con respecto al testigo susceptible, pero menos que el testigo resistente G12952. En comparación con Pijao, todas las líneas con arcelina 1 fueron significativamente superiores en términos de porcentaje de emergencia, días a emergencia y los respectivos índices de susceptibilidad. Otro aspecto importante para destacar en estas líneas radica en el hecho de que 55 días después de infestadas presentaron un porcentaje de daño menor o similar al del testigo resistente (Tabla 3) y fueron significativamente superiores al testigo susceptible, Pijao, el cual alcanzó valores de porcentaje de daño cercanos al 100%.

**Tabla 1.** Efecto de cinco variantes electroforéticas de arcelina sobre la biología de *Z. subfasciatus*<sup>1)</sup>.

Genotipo	Variante de arcelina	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Índice de susceptibilidad <sup>2</sup> (Is)
G12882	1	9,3 d	51,0 c	1,0
G12866	2	20,5 c	48,8c	2,3
G12922	3	79,5 b	42,0 d	7,7
G12952	4	8,4de	70,0 a	0,8
G02771	5	4,0 e	64,6 b	- 0,3
Calima	-	94,0 a	32,9 e	10,7

1) Promedio de cuatro evaluaciones y cinco repeticiones por evaluación. En cada columna, los promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 1% (Duncan)

$$Is = \frac{\log n (\text{progenie/hembra})}{\text{días a emergencia}} \times 100$$

**Tabla 2.** Resistencia a *Z. subfasciatus* en líneas de frijol seleccionado por la presencia de cuatro variantes de arcelina.

Variante de arcelina en padre donante	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Índice de susceptibilidad <sup>2</sup>
<b>Líneas Mejoradas</b>			
1	3,5 e <sup>1)</sup>	51,2 b	0,3
2	33,2 c	42,3 c	4,5
3	83,8 b	32,2 d	9,6
4	92,1 ab	40,9 c	7,9
<b>Testigos</b>			
G12952 (resistente)	9,2 d	62,3 a	0,9
Pijao (susceptible)	97,2 a	33,5 d	10,0

1) Promedio de cuatro evaluaciones y cinco repeticiones por evaluación. En cada columna, los promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 1% (Duncan)

$$Is = \frac{\log n (\text{progenie/hembra})}{\text{días a emergencia}} \times 100$$

Aparte de los aspectos entomológicos favorables, estas líneas presentaron buenas características agronómicas (Tabla 4), expresados en tamaños y colores de granos comerciales con características deseables para diferentes tipos de consumidores. Cuando se sembraron durante tres semestres consecutivos presentaron hábitos de crecimiento arbustivo y días a floración comparables con los del testigo comercial, Pijao; produjeron también altos rendimientos, en la mayoría de los casos superiores al testigo en mención. Además, tuvieron características favorables de aceptabilidad, pues registraron bajos tiempos de cocción con un rango de 16 minutos en RAZ 2, que representa un frijol blando, a 23 minutos en RAZ 5 y RAZ 10, valores normales para el frijol, e inferiores a los del testigo comercial (Tabla 4).

Como la obtención de estas líneas con resistencia al gorgojo del frijol se ha logrado por la transferencia de arcelina a frijoles cultivados y debido a que ésta es una proteína nueva, se consideró indispensable hacer evaluaciones biológicas para establecer posibles efectos tóxicos en mamíferos. Los resultados obtenidos en la Universidad de Michigan, el Instituto de Nutrición de Centro America y Panamá (INCAP), la Universidad de Durham y el CIAT indican que no existen problemas toxicológicos, ya que se trata de una proteína lábil que se degrada cuando el frijol es cocinado.

Los resultados descritos indican que es posible obtener en frijol almacenado, al-

**Tabla 3.** Niveles de susceptibilidad y de daño en líneas de frijol mejoradas por resistencia a *Z. subfasciatus*. Datos promedio de cuatro evaluaciones consecutivas en tres y cuatro repetición por evaluación.

Genotip	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Indice de susceptibilidad <sup>1)</sup>	Porcentaje de semillas dañadas 55 DDI <sup>2)</sup>
<b>Líneas mejoradas</b>				
RAZ 1	1,8 b <sup>3)</sup>	53,0 bc	- 1,3	13,4 bc
RAZ 2	2,5	53,9 b	- 0,8	9,4 bc
RAZ 3	3,2 b	51,8 bc	- 0,7	11,0 bc
RAZ 4	2,9 b	53,8 b	- 0,5	12,3 bc
RAZ 5	3,4 b	48,5 c	- 0,4	11,2 bc
RAZ 6	4,3 b	50,1 bc	- 0,2	13,6 bc
RAZ 7	3,8 b	49,5 bc	0,07	21,0 b
RAZ 8	4,1 b	51,2 bc	0,06	16,3 bc
RAZ 9	4,0 b	50,2 bc	0,3	14,8 bc
RAZ 10	4,7 b	50,8 bc	0,3	17,5 bc
<b>Testigo</b>				
G12952	5,4 b	60,2 a	0,7	11,4 bc
Pijao	99,4 a	34,4 d	9,3	97,1 a

1) 
$$I_s = \frac{\log n (\text{progenie/hembra})}{\text{días emergencia}} \times 100$$

2) DDI=Días después de infestación.

3) En cada columna, los promedios seguidos por la misma letra no difieren significativamente al nivel del 1% (Duncan).

tos niveles de protección contra *Z. subfasciatus* cuando se mejora para resistencia con padres donantes de arcelina 1 y que el esquema de mejoramiento genético implementado permitió obtener líneas con las características comerciales deseables de los padres recurrentes utilizados.

**BIBLIOGRAFIA**

CARDONA, C.; POSSO, C.E.; KORNEGAY, J.; VALOR, J.; SERRANO, M. 1989. Antibiosis effects of dry wild bean accessions on the Mexican weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v.82, p. 310-315.

-----; KORNEGAY, J. 1989. Uso de *Phaseolus vulgaris* silvestres para mejorar frijol por resistencia a los brúchidos. En: BEEDE, S. (ed.). *Temas Actuales de Mejoramiento Genético de Frijol Común*. Cali, CIAT. p. 94-103. (Documento de Trabajo No. 47).

CENTRO DE AGRICULTURA TROPICAL. 1988. Informe Anual 1987. Programa de Frijol, CIAT. Cali, CIAT. p. 143-161. (Documento de Trabajo No. 47).

DOBIE, P. 1974. The laboratory assessment of the inherent susceptibility of maize varieties to post-harvest infestation by *Sitophilus zeamais* Hostsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* (Estados Unidos) v.10, p.183-197.

**Tabla 4.** Características agronómicas y de calidad culinaria de líneas de frijol mejoradas por resistencia a *Z. subfasciatus*.

Genotipo	Color de Semilla	Peso g/100 semillas	hábito de crecimiento	Días a floración	Rendimiento (Kg/ha)	Tiempo de cocción (minutos)
RAZ 1	Blanco	18,3	I <sup>1)</sup>	34	2836	21,5
RAZ 2	Blanco	20,0	II	32	2380	16,0
RAZ 3	Crema	25,1	III	31	2453	22,5
RAZ 6	Crema jaspeado	30,0	II	34	2490	21,0
RAZ 7	Blanco	21,0	I	32	3740	17,0
RAZ 8	Crema jaspeado	23,0	II	34	3277	22,0
RAZ 9	Rosado	34,3	II	34	3088	21,0
RAZ 10	Crema y rosado	27,0	II	34	3211	23,0
Pijao	Negro	21,4	II	35	2389	23,5

- GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; SUSSDORF, D.H. 1977. Gel diffusion. In: Methods in Immunology. 3rd. ed. New York, Addison Wesley Publ. Co. p.313-327
- HARMSSEN, R. 1989. Bruchid resistance and agronomic traits of cultivated bean lines (*Phaseolus vulgaris*) containing arcelin seed protein alleles from wild beans. Madison, University of Wisconsin. 135 p. (Ph.D. Thesis.)
- ;BLISS, F.A.; CARDONA, C.; POSSO, C.E.; OSBORN T.C. 1988. Transferring genes for arcelin protein from wild to cultivated beans: implications for bruchid resistance. En: Annual Report. Bean Improvement Cooperative v. 31, p. 54-55.
- LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Inglaterra) v.22, p. 680-685.
- LIOI, L.;BOLLINI, R. 1989. Identification of a new arcelin variant in wild bean seeds. En: Bean Improvement Cooperative. v.32, p.28.
- Ma,L.; BLISS, F.A. 1978. Seed proteins of common bean. Crop Science (Estados Unidos). v. 18, p. 431-437.
- OSBORN, T.C.; BLAKE, T.; GEPTS, P.; BLISS, F.A. 1986. Bean arcelin 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. Theoretical and Applied Genetics (Alemania) v.71, p. 847-855.
- ; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science (Estados Unidos) v.240, p. 207-210.
- OUCHTERLONY, O. 1968. Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Ann Arbor, MI., Ann Arbor Science Publishers 125p.
- ROMERO ANDREAS, J.; YANDELL, B.S.; BLISS, F.A. 1986. Bean arcelin 1. inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effects on seed composition. Theoretical and Applied Genetics (Alemania) v. 72, p. 123-128.
- SAS INSTITUTE INCORPORATED. 1985. SAS user's guide: Statistics. 5 ed. Cary, N.C., SAS Institute, 956p.
- SCHOONHOVEN, A. VAN; CARDONA, C. 1982. Low levels of resistance to Mexican bean weevil in dry beans. Journal of Economic Entomology (Estados Unidos) v. 75, p. 567-569.
- ;-----;VALOR, J. 1983. Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in noncultivated common bean accessions. Journal of Economic Entomology (Estados Unidos) v. 76, p. 1255-1259.