

Desarrollo de líneas de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia a BCMV, BGYMV y mejor adaptación en suelos bajos en N.

Por

Luis A. Ruiz Quiles

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en

Agronomía

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2010

Aprobado por:

James S. Beaver, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Timothy Porch, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Consuelo Estevez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Hipólito O'Farrill, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Alberto Santana, Ph.D.
Representante Estudios Graduados

Fecha

Resumen

El Virus del Mosaico Común de la Habichuela (BCMV) y Virus del Mosaico Dorado Amarillo de la Habichuela (BGYMV) son una amenaza para la producción de la (*Phaseolus vulgaris* L.), a través del Caribe y Centroamérica. Los agricultores en esta región se tienen que confrontar con el incremento en el costo de los fertilizantes nitrogenados y también con la producción de habichuelas en suelos marginales. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue desarrollar líneas de habichuela que tengan una resistencia combinada a BCMV y BGYMV, y toleren suelos con niveles bajos de nitrógeno. El rendimiento de las 590 líneas F₃ representadas en 12 diferentes poblaciones se evaluaron en ensayos replicados que fueron sembrados en Junio del 2009 en las fincas de investigación de la Subestación Experimental Agrícola de Universidad de Puerto Rico (SI) y en USDA-ARS-TARS (ST), ambas localizadas en Isabela, Puerto Rico. Los ensayos sembrados en (SI) recibieron 20 kg/ha de nitrógeno, mientras que los ensayos sembrados en (ST) no recibieron fertilización. Diez de las doce poblaciones de las líneas F₃ no tuvieron un buen desempeño porque fueron susceptibles a la bacteriosis común causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y también por la baja tolerancia a suelos de baja fertilidad. El efecto de la pudrición de raíz sobre estas poblaciones tampoco les favoreció. Las líneas derivadas de los cruces PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven fueron seleccionadas para evaluaciones futuras por la calidad de semilla comercial, poseer características agronómicas deseables y por su alto rendimiento. Los rendimientos de las líneas F₃ seleccionadas fueron similares a la línea control PR0518-10, y superiores a la mayoría de las líneas de los ensayos

de las habichuelas negras del ensayo VIDAC de Centro América que fueron sembradas en el SI. Las líneas seleccionadas se evaluaron en ensayos de campo replicados sembradas sin fertilización en la SI en febrero y junio del 2010. Varias líneas de las poblaciones de PR0518-10 /PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven produjeron semillas con rendimientos similares a la líneas control PR0518-10, las cuales fueron consideradas porque tienen tolerancia a suelos con niveles bajo de nitrógeno. Evaluaciones de invernadero usando la cepa NL3 del virus del mosaico común necrótico de la habichuela, fueron usadas para identificar las líneas que poseían el gen *I* dominante para resistencia al BCMV. La Región Amplificada de Secuencia Caracterizada (SCAR por sus siglas en inglés) del marcador SR-2 fue usada para seleccionar las líneas con el gen recesivo *bgm-I* para resistencia a BGYMV. Una línea de grano color blanco y cuatro líneas de grano color negro tuvieron un desempeño superior en suelos con bajo contenido de nitrógeno, especialmente suelos de tipo oxisol en donde la cantidad de N que había disponible en el suelo fue de 2 ppm en ST y 7 ppm en SI y también tuvieron resistencia al BCMV y al BGYMV. Estos suelos se comparan con muchas áreas en Latinoamérica y África en donde los campos agrícola son bajos en N. Rendimientos promedios > 1,000 kg/ha fueron obtenidos de estas líneas en los diferentes ensayos. Plantas individuales fueron seleccionadas de estas líneas para reevaluarlas y confirmar los genes de resistencia al virus. Por los buenos resultados obtenidos en los ensayos el desempeño de las líneas hermanas seleccionadas serán validadas en ensayos de rendimiento replicados en Puerto Rico, Haití y Honduras. Las líneas seleccionadas en los ensayos de Junio 2009 y 2010 podrían tener tolerancia a altas temperaturas ambientales por

lo que se podría confirmar con evaluaciones posteriores. Aunque, aún está por confirmarse, estas líneas podrían poseer niveles moderados de resistencia a bacteriosis común y pudrición de raíz. El vigor de plantas durante el estado vegetativo fue asociado con buen comportamiento en suelos con bajos niveles de nitrógeno. En contraste, no hubo una asociación entre los resultados de los valores de nodulación y el rendimiento de semilla en suelos con niveles bajos de nitrógeno disponible. Esto nos da una indicación de que las líneas fueron eficientes en la adquisición y utilización del nitrógeno disponible en el suelo que las plantas que tuvieron una mejor nodulación. Los campos de experimentación no fueron inoculados con *Rhizobium* para así realizar una selección más eficiente de aquellas plantas que realmente mostraran tolerancia a suelos bajos de N.

Abstract

Bean Common Mosaic Virus (BCMV) and Bean Golden Yellow Mosaic Virus (BGYMV) are a threat to bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production throughout Central America and the Caribbean. Farmers in the region must also deal with the increased cost of nitrogen fertilizer and production of beans on marginal soils. Therefore, the objective of this research was to develop bean lines that combine resistance to BCMV and BGYMV with greater tolerance to soils with low levels of nitrogen. The performance of 590 F₃ lines representing 12 different populations were evaluated in replicated trials planted in June 2009 at the University of Puerto Rico (SI) and the USDA-ARS-TARS (ST) research farms near Isabela, Puerto Rico. The trial planted at the SI received 20 kg/ha of N fertilizer whereas the trial planted at the ST was not fertilized. The F₃ lines from 10 of the 12 populations did not perform well due to susceptibility to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and poor adaptation to the low soil fertility. Lines derived from the crosses PR0518-10 / PR0401-257 and PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven that had commercial seed types, desirable agronomic traits and higher seed yield were selected for further testing. Seed yields of the selected F₃ lines were similar to the check line PR0518-10 and superior to most of the entries in the VIDAC black bean trial from Central America that was planted at the SI. The selected lines were evaluated in replicated field trials planted without fertilization at the SI in February and June 2010. Several lines from the PR0518-10 / PR0401-257 and PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven populations produced seed yields similar to the check line PR0518-10, which is considered to be tolerant to low N soils.

Greenhouse screening using the NL3 strain of Bean Common Mosaic Necrosis Virus was used to identify lines that possessed the dominant *I* gene for resistance to BCMV. The Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker SR-2 was used to select lines with the recessive gene *bgm-1* for resistance to BGYMV. One white and four black-seeded lines combined superior performance in low N soils with resistance to BCMV and BGYMV. Individual plants will be selected from these lines and re-tested to confirm the presence of the virus resistance genes. The performance of the sister lines will be validated in replicated yield trials that will be planted in Puerto Rico, Haiti and Honduras. Lines that performed well in the June 2009 and 2010 planting likely have tolerance to high temperatures. Although it needs to be confirmed, these lines may also possess at least moderate levels of resistance to common bacterial blight and root rot. Good plant vigor during the vegetative stage of development was associated with tolerance to low N soils. In contrast, no association was observed between nodulation scores and performance in low N soils. This suggests that the lines were more efficient in the acquisition and utilization of available soil N than the other plants had better nodulation but they didn't had good performance. On the experimental field, the soil were not inoculated with *Rhizobium* because of this we were able to select the most efficient plants that show tolerance in soil with low N.

Declaratoria de derechos de autor

© Luis A. Ruiz Quiles, 2010.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia por todo el apoyo que me dieron durante el transcurso de estos años en especial a mis padres, Anibal Ruiz Pérez y Maribel Quiles Velázquez, a mis hermanos Christian y Zuleyka por su inspiración y a mi gran amor Jennyliz.

Reconocimientos

A Dios primeramente por darme la vida y la salud y todo lo que necesité para llevar a cabo esta investigación. Mi familia que estuvo dándome el apoyo que siempre necesité y por inculcarme la gran importancia que tiene la agricultura en la vida de los seres humanos. A Jennyliz por soportarme y darme su apoyo incondicional aunque no podía dedicarle el tiempo que ella se merecía.

A mis compañeros de trabajo Sonia que fue mi primera maestra en los trabajos moleculares, Abiezer quien estuvo mano a mano conmigo ayudándome en el trabajo de campo al igual que Mónica y Antonio quienes también me dieron la mano tanto en el campo como en el laboratorio. Y a mis compañeros de la universidad Gisseiry, Verónica y Omara por su apoyo.

A Dr. Beaver quien me dio la oportunidad de poder completar mi grado de maestría con él y ser mi presidente de comité. Gracias por toda la ayuda que me brindó y por guiarme y enseñarme muchas cosas en el mundo del mejoramiento de plantas. A los demás miembros de mi comité Dr. Tim Porch por permitirme realizar los trabajos moleculares en su laboratorio y por todo lo que me enseñó, gracias por estar mano a mano conmigo y a la Dra. Consuelo Estévez por aceptar ser parte de mi comité y ayudarme en el área de la fitopatología.

A todos mis profesores por darme las herramientas necesarias para poder completar mi grado de maestría y por todo el conocimiento que adquirí de ustedes. Reconozco toda la

ayuda que me brindó la Dra. Linda Beaver quien me instruyó en muchas cosas del área de la estadística.

A todo el personal del Departamento de Agronomía y Suelos en especial a Gloria, Evelyn, Floripe, Janice y Jeannette por ayudarme en muchas de mis situaciones y todo lo relacionado a cosas oficiales. A todos los empleados que laboran en la Estación Experimental Agrícola de Isabela en especial a Kemuel, Sammy, Alfredo, Erick y Seguinot por toda la ayuda que me brindaron en el trabajo de campo de mis ensayos.

A la Dra. Myrna Alameda por toda su ayuda ofrecida en los trabajos de inoculación de plantas en los invernaderos y a Rocío por permitirme usar su laboratorio y por toda la ayuda que me brindó en el área de las estadísticas. Al Dr. Feiko Ferwerda por también prestarme su laboratorio y ayudarme en los trabajos moleculares.

A los oficiales del Departamento de Estudios Graduados por toda su atención y ayuda ofrecida durante el transcurso de estos años. Y a todas aquellas personas que de alguna manera u otra han colaborado conmigo. Les estaré muy agradecido. Gracias.

Tabla de contenido

Resumen.....	ii
Abstract.....	iv
Declaratoria Derechos de Autor.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Reconocimientos.....	viii
Tabla de Contenido.....	x
Lista de Cuadros.....	xi
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Apéndices.....	xv
Introducción.....	1
Objetivos.....	4
Revisión de Literatura.....	4
Materiales y Métodos.....	11
Resultados y Discusiones.....	27
Conclusiones.....	59
Recomendaciones.....	65
Referencias.....	66
Apéndice.....	71

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Medias mensuales de temperatura, precipitación y evaporación en la Estación Experimental Agrícola de Isabela, Puerto Rico.	11
Cuadro 2. Listado de poblaciones F ₂ sembradas en la Subestación de Isabela en Febrero de 2009.	15
Cuadro 3. Ensayos sembrados en Junio 2009 en el campo para evaluación para tolerancia a baja fertilidad de suelo y resistencia a pudrición de la raíz.	16
Cuadro 4. Escala de evaluación del CIAT para vigor de la planta.	17
Cuadro 5. Escala de evaluación del CIAT para pudrición de raíz.	17
Cuadro 6. Escala de evaluación del CIAT para nodulación.	17
Cuadro 7. Escala de evaluación del CIAT para enfermedades foliares.	18
Cuadro 8. Lista de las entradas en el ensayo de las líneas F ₄ de la población PR0518-10 /PR0401-257 sembradas en Isabela Puerto Rico en Febrero 2010.	19
Cuadro 9. Lista de las entradas en el ensayo de líneas F ₄ de la poblaciónPR0518-10 ///VERANO//PR0003-124/RAVEN sembradas en Isabela Puerto Rico en Febrero 2010.	20
Cuadro 10. Lista de las líneas más prometedoras obtenidas de la población PR0518-10 / PR0401-257 evaluadas para rendimiento y resistencia a BCMV y BGYMV en Junio 2010.	21
Cuadro 11. Lista de las líneas más prometedoras obtenidas de la población PR0518-10 ///VERANO//PR0003-124/RAVEN evaluadas para rendimiento y resistencia a BCMV y BGYMV en Junio 2010.	22
Cuadro 12. Análisis de suelos de los campos experimentales.	28
Cuadro 13. Tabla de análisis de varianza del VIDAC Negro sembrada en Isabela Puerto Rico en Junio de 2009.	29
Cuadro 14. Rendimientos promedio de líneas del VIDAC Negro sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	29

Cuadro 15. Tabla de análisis de varianza de la población PR0003-124 / Raven// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	31
Cuadro 16. Rendimientos promedios de líneas F ₃ de la población PR0003-124 / Raven// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	31
Cuadro 17. Tabla de análisis de varianza de la población PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	32
Cuadro 18. Rendimientos promedios de líneas F ₃ de la población PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	33
Cuadro 19. Tabla de análisis de varianza de la población PR0340-3-3-1/PR0518-10 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	34
Cuadro 20. Rendimientos promedios de líneas F ₃ de la población PR0340-3-3-1/PR0518-10 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.	34
Cuadro 21. Tabla de análisis de varianza de la población XRAV-117-2/PR0401-277 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	35
Cuadro 22. Rendimientos promedio de líneas F ₃ de la población XRAV-117-2/PR0401-277 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	36
Cuadro 23. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	38
Cuadro 24. Rendimientos, lecturas de nodulación y por ciento de plantas con pudrición de líneas F ₃ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	39
Cuadro 25. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	41
Cuadro 26. Rendimientos, lecturas de nodulación y por ciento de plantas con pudrición de líneas F ₃ de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2009.	42

Cuadro 27. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Febrero de 2010.	48
Cuadro 28. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de líneas F ₄ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Febrero de 2010.	49
Cuadro 29. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Febrero de 2010.	50
Cuadro 30. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de líneas F ₄ de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Febrero de 2010.	50
Cuadro 31. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2010.	56
Cuadro 32. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de raíz de líneas F ₅ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2010.	57
Cuadro 33. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2010.	58
Cuadro 34. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de raíz de líneas F ₅ de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en Junio de 2010.	58
Cuadro 35. Resumen del comportamiento de las líneas seleccionadas de la población derivada del cruzamiento PR0518-10 / PR0401-257.	63
Cuadro 36. Resumen del comportamiento de las líneas seleccionadas de la población derivada del cruzamiento PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven.	64

Lista de Figuras

Figura 1. Reacción hipersensitiva de algunas de las líneas a la inoculación con NL3.	53
Figura 2. Evaluación de las líneas de habichuela de la población 1038(0951) y 1039(0956) en gel para el marcador SR-2.	54
Figura 3. Continuación de las líneas de habichuela de la población 1039(0956) para evaluación en el gel del marcador SR-2.	54

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Efecto que causa la pudrición de raíz en raíces de habichuela.	71
Apéndice 2. Nodulación de algunas de las mejores líneas de habichuela.	72
Apéndice 3. Raíz de líneas de habichuela sin presencia de nódulos.	72

Introducción

La habichuela común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las fuentes principales de proteína de la población tanto rural como urbana que carecen de recursos en Centroamérica y el Caribe. En Puerto Rico para el año 2007/08 la producción de habichuela tuvo un valor acumulado de \$712,174 por lo que esta leguminosa tiene su importancia en la agricultura local (Departamento de Agricultura, 2010). El rendimiento y la calidad de semilla de habichuela son afectadas por varios factores bióticos y abióticos. Las enfermedades pueden causar grandes pérdidas en las siembras de este cultivo (Araya 2003). Los Virus del Mosaico Dorado Amarillo (BGYMV), el virus del Mosaico Común (BCMV) y el Virus del Mosaico Común Necrótico (BCMNV) son enfermedades importantes que pueden limitar el rendimiento de habichuela en Puerto Rico (Beaver et al. 2006). Los factores abióticos como la sequía, altas temperaturas y factores edáficos como baja fertilidad del suelo también pueden reducir el rendimiento de la habichuela (Voysest, 2000).

Por lo menos 3 millones de kilómetros cuadrados de campos agrícolas en el Caribe y América Latina sufren pérdidas en productividad porque los suelos tienen niveles sub-óptimos de fertilidad (PNUMA 2003). Los suelos de tipo oxisol y ultisol, que son comunes a través del Caribe, se caracterizan por tener baja fertilidad (Urquiaga et al. 2005). Por lo tanto, es necesario desarrollar variedades de habichuela para nuestra región que tengan mejor adaptación a estos tipos de suelo.

La falta de nitrógeno (N) puede limitar la producción de habichuela (Vargas 2008). Bajos niveles de N en el suelo reducen los rendimientos de habichuela porque el

cultivo no puede sostener una producción alta solamente con la fijación biológica (Rahman et al. 2007). El aumento en el costo de los fertilizantes ha incrementado el costo de producción y, en ciertos casos, ha resultado en una reducción en el uso de este valioso insumo. Algunas variedades o líneas de habichuela poseen mayores niveles de tolerancia a los suelos deficientes en nutrientes, pero no poseen otras características que los agricultores necesitan tales como resistencia a las enfermedades o tipo de grano.

Esta investigación pretende seleccionar líneas de habichuela que posean mayores niveles de tolerancia a baja disponibilidad de N en el suelo y resistencia al Virus del Mosaico Común de la Habichuela (BCMV) y al Virus del Mosaico Dorado Amarillo de la Habichuela (BGYMV). El desarrollo de líneas que posean estas características requiere de un largo tiempo de selección ya que la interacción de los genotipos con el ambiente dificulta la selección de estos rasgos. La tolerancia a estrés abiótico tiende a ser un rasgo cuantitativamente heredado lo que obliga a que los fitomejoradores trabajen con poblaciones grandes para poder identificar las líneas que tienen un desempeño superior (Beaver & Osorno 2009).

Se pretende desarrollar líneas de habichuela que poseen el gen *bgm* para resistencia al BGYMV, el gen *I* para resistencia al BCMV. También, pretendemos realizar evaluaciones de las líneas para determinar la posible presencia del gen *bc-3* de resistencia al BCMNV. Las líneas que combinan resistencia al virus y tolerancia a baja fertilidad del suelo serán evaluadas en Puerto Rico y otros países en Centroamérica y el Caribe. Así se puede mejorar la agricultura de subsistencia que utilizan muchos agricultores (Rosas et al. 2003). La habichuela es un recurso importante para los

pequeños y medianos agricultores en Puerto Rico tanto para subsistencia como para medio de ingreso por lo que se hace necesario ofrecerle y facilitarle al agricultor fuentes adecuadas de este cultivo para que pueda haber un desarrollo sustentable de la agricultura. El desarrollo y mejoramiento de esta leguminosa son importantes para mover al agricultor a una mejor agricultura en Puerto Rico.

Objetivos

1. Seleccionar líneas de habichuela que combinen buen potencial de rendimiento, tipo de semilla comercial, porte erecto de la planta, tolerancia a bajos niveles de Nitrógeno en el suelo y resistencia a los virus BCMV y BGYMV.
2. Utilizar marcadores moleculares para identificar líneas de habichuela que posean resistencia al BCMV, BGYMV y tolerancia a suelos bajos en Nitrógeno.

Revisión de Literatura

El Virus del mosaico dorado amarillo de la habichuela (BGYMV) causa daños y pérdidas considerables en los cultivos de habichuela en Centroamérica y el Caribe. Morales, 2000 estableció que en la década de los 80 del pasado siglo el BGYMV fue catalogado como la enfermedad más catastrófica del cultivo de la habichuela de todos los tiempos. Esta enfermedad obtuvo valores de incidencia de hasta un 80% y se reportaron pérdidas de entre 40-100% (Echemendía et al. 2010). La transmisión del virus es llevada a cabo por la mosca blanca [*Bemisia tabaci* (Gennadius)], (Morales, 1994). En Puerto durante la época de 1989-1995 las pérdidas provocadas por la mosca blanca fueron de \$40(US) millones (Polston & Anderson, 1999). Los síntomas de la enfermedad son plantas con clorosis, formación de moteado en las hojas que va desde amarillo hasta amarillo intenso con una coloración blanca en las venas. Las hojas tienden a enrollarse hacia la parte inferior y hay deformación de vainas (IICA, 2008). Los métodos de control empleados para este virus incluyen el mejoramiento genético de variedades de habichuela

común y el uso de insecticida para reducir las poblaciones del vector (Dardon ,1993). La presencia de este virus en PR es mínima debido a las prácticas de control de los agricultores sobre las poblaciones de los vectores.

Las evaluaciones iniciadas en 1974 por investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) permitieron la identificación de líneas de habichuela de grano de color negro con niveles moderados de resistencia al BGYMV en América Central (Yoshii et al. 1979). En otro estudio se encontró que la línea A 429 mostró un alto nivel de resistencia al BGYMV en evaluaciones de campo (Singh et al. 1991). Velez et al. (1998) identificó que A 429 tiene el gen recesivo, *bgm-1*, que confiere resistencia al BGYMV. Urrea et al. (1996) identificó un marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) co-dominante para el gen *bgm-1*. Este marcador RAPD fue convertido al marcador SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) SR-2 por el CIAT.

Los potivirus BCMV y BCMNV se encuentran distribuidos de manera amplia a nivel mundial. Estos virus pueden causar pérdidas de hasta un 80% y la semilla que se cosecha de las plantas infectadas son de inferior calidad (Diez-Navajas et al, 2003). El BCMNV además de transmitirse por el vector *Aphis fabae* puede propagarse a través de la semilla, siendo ésta primordialmente la fuente de inoculo inicial y la responsable de la infección inicial de la planta y su propagación en el campo (Peña & Trujillo, 2007). Los síntomas comunes de estas enfermedades son: aparición de clorosis, poco desarrollo vegetativo, y malformaciones en la hojas en el caso de BCMV y lesiones necróticas tanto

en hojas como en tallos y muerte de la planta para el BCMNV según citado por (Drijfhout, 1978).

La pudrición de la raíz de la habichuela es una enfermedad asociada a un complejo de hongos de suelo: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, y *Pythium* spp. entre otros. Estos hongos atacan las raíces, reducen el crecimiento de la planta y el rendimiento, y causan marchitez de las plantas (Montiel et. al 2005). *Rhizoctonia solani* puede causar pérdidas de hasta 50% en los rendimientos (IICA 2008). Los síntomas incluyen puntos rojizos, canchales rojizos u oscuros y deformación de la raíz principal (IICA 2008). La presencia de suelos húmedos, y pesados y temperaturas entre 20-25°C son condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Este hongo puede sobrevivir en los restos de cosechas anteriores lo que provoca aumentos en daño cuando se siembra habichuela en el mismo campo año tras año (IICA 2008). *Fusarium* es uno de los hongos más complejos y diversos que existen. Las especies de este género más estudiadas y que más resaltan como patógenos de la raíz de habichuela son *F. oxysporum* y *F. Solani*. Entre los síntomas que causa está la decoloración del tejido externo de la raíz y una coloración rojiza del tejido vascular (Sánchez et al. 2006). En el caso de *Pythium* la pudrición de raíz ocasionada por varias especies puede afectar la semilla que está en germinación, las yemas terminales y hasta el tejido que se encuentra en el hipocotilo (Abawi, 1989).

El daño causado por la pudrición de raíz puede ser peor en suelos con baja fertilidad ya que el abastecimiento de nutrientes a la planta a través del suelo se ve afectado (Trinidad et al., 1999).

La resistencia genética a los limitantes bióticos y abióticos ayuda a reducir los costos de producción y permite que el agricultor reduzca el uso de insumos tales como los pesticidas que podrían dañar el medio ambiente (Beaver y Osorno 2009). Los programas de mejoramiento de habichuela en las zonas tropicales dedican grandes cantidades de tiempo y recursos al desarrollo de cultivares con resistencia a las enfermedades. La resistencia a los estreses abióticos y bióticos podría obtenerse mediante la implementación de técnicas de mejoramiento genético convencionales y el uso de selección asistida por marcadores moleculares. El uso de los marcadores moleculares requiere la identificación y estudio de los genes, su mapeo y etiquetado (Miklas et al., 2006).

Beaver y Osorno (2009) discutieron las ventajas de utilizar retrocruzamiento como método de mejoramiento de la habichuela para la incorporación de características controladas por genes específicos como es el caso para los genes de resistencia al BCMNV y BGYMV. Este método permite mantener las características deseables del padre recurrente.

La selección de individuos con los rasgos deseados, como presencia de genes de resistencia, se puede realizar por selección asistida con marcadores moleculares. Estos marcadores están asociados a genes que confieren o están ligados a la resistencia (Kelly et al., 1994). La resistencia a todas las cepas de BCMV en la habichuela es conferida por el gen *I*. Sin embargo, este gen por sí solo no provee resistencia contra BCMNV por lo que la planta va a presentar una reacción hipersensitiva necrótica mortal en la planta. Por esta razón se hace necesario el uso de genes recesivos como (*bc-1*, *bc-1*², *bc-2*, *bc-2*², *bc-*

3 y *bc-u*), o combinar el gen *I* con el gen *bc-3* para darle una protección al BCMV y BCMNV (Miklas et al., 1998). La selección de genotipos de habichuela resistentes al virus del mosaico dorado amarillo y mosaico común necrótico se puede lograr utilizando marcadores moleculares SCAR SR-2 para el gen *bgm-1* y SW13 para el gen *I*. La eficiencia de la selección utilizando el marcador SR-2 para plantas resistentes al BGYMV es muy alta (Alameda et al., 2004). La validación del método para la selección de líneas con SR-2 fue evaluada por Echemendía en 2007 encontrando buenos resultados.

Kelly, J. et al., (1994) reafirmó la importancia de utilizar las nuevas tecnologías basadas en marcadores moleculares para detectar genes de resistencia en cultivares de habichuela ya que estas permiten la selección indirecta en ausencia del patógeno. Los marcadores moleculares permiten una detección más efectiva de los genes de interés y se convierte en una herramienta de gran utilidad en los programas de fitomejoramiento. Los estudios llevados a cabo anteriormente no lograron desarrollar líneas de habichuela que tuvieran un nivel alto de tolerancia a suelos con baja fertilidad. Por lo que se hace necesario ampliar la base genética de las poblaciones de mejoramiento si se pretende mejorar la adaptación de la habichuela a suelos pobres (Araya-Acosta, 2000).

Acuña, 1996 establece que la reserva de nitrógeno en el suelo es limitada por lo que se hace necesario tener que aplicar fertilizantes a la planta para satisfacer su demanda. También habla de que las plantas de la familia de las leguminosas pueden satisfacer las necesidades restantes de nitrógeno por medio de la Fijación Biológica de Nitrógeno, el cual es un proceso en donde se establece una simbiosis entre la leguminosa y bacterias del genero *Rhizobium*. Sundstrom et al., (1982) realizaron evaluaciones sobre el efecto

de la compactación del suelo y la fertilización nitrogenada en la nodulación de la planta. Ellos observaron que en densidades aparentes bajas la cantidad de nódulos en las raíces disminuía y que aplicaciones de nitrógeno mayores a 25 kg/ha de nitrógeno también disminuía la nodulación en la planta. Otros estudios que evaluaron el efecto del pH en la nodulación de la habichuela encontraron que a pHs menores a 5.5 y mayores a 6.8 afectaban severamente la formación de nódulos en las raíces (Vencatasamy et al., 1981). Por otra parte se ha encontrado que en suelos de baja fertilidad y que poseen pH ácidos si se fertiliza con fósforo y calcio se puede ver un efecto beneficioso en la formación de nódulos (Acuña et al., 1989). El desarrollo de nódulos en la fijación biológica puede verse afectado por factores ambientales, de suelos y ecológicos (Acosta, 1996).

Comparado con otras leguminosas de grano, la habichuela tiende a fijar cantidades pequeñas de nitrógeno atmosférico que no es suficiente para sostener altos rendimientos de semilla (Bliss, 1993). Bliss encontró líneas mejoradas capaces de fijar suficiente nitrógeno atmosférico como para sostener rendimientos de semillas de 1000 kg/ha e identificó fuentes de germoplasma de habichuela con mayor potencial de fijación de nitrógeno. Muller et al. (2004) establece que se hace necesario la aplicación de pequeñas cantidades de N para obtener rendimientos adecuados. Debido a la falta de recursos necesarios para obtener o comprar este insumo se hace necesario desarrollar líneas con mayores niveles de tolerancia a los suelos con baja fertilidad. Singh et al. (2003) lograron identificar líneas de habichuela provenientes de Centroamérica con mayor tolerancia a baja fertilidad de suelo. Ellos recalcaron la importancia de seguir

llevando a cabo estudios para desarrollar líneas con mejor adaptación a los sistemas agrícolas que utilizan pocos insumos externos.

Materiales y Métodos

Se llevaron a cabo ensayos de campo para avanzar generaciones F_2 que provienen de cruces entre líneas que poseen diferentes características (Cuadro 2), realizar selección de plantas individuales y evaluar para tolerancia ha contenido bajo de N en el suelo (Cuadro 11). La mayoría de los ensayos (12) se sembraron en la Subestación de Isabela de la Universidad de Puerto Rico. Los otros ensayos se sembraron en la Estación Federal (TARS-USDA-ARS) en de Isabela, Puerto Rico. Éstas Estaciones Experimentales están localizadas al noroeste de Puerto Rico a longitud de 67.3° y latitud de 18.3° . Ambos tienen una elevación de 128 m sobre el nivel del mar y el promedio de la precipitación anual es 1524 mm. El tipo de suelo es del orden de los Oxisoles serie Cotto (very-fine Kaolinitic Isohyperthermic Typic Eustrustox). Estos son suelos clasificados como arcillosos, ácidos y con un grado de fertilidad intermedio. La temperatura promedio durante los meses que se llevaron a cabo los experimentos estuvo alrededor de los 26.2°C y la precipitación promedio fue de 148 mm por mes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias mensuales de temperatura, precipitación y evaporación en la Estación Experimental Agrícola de Isabela, Puerto Rico.

Mes	Temperatura máxima ($^\circ\text{C}$)	Temperatura mínima ($^\circ\text{C}$)	Temperatura media ($^\circ\text{C}$)	Precipitación (mm)	Evaporación (mm)
Junio 2009	29.8	22.7	26.2	218	147
Julio 2009	30.0	23.7	26.8	37	164
Agosto 2009	30.0	23.6	26.8	120	173
Febrero 2010	27.7	21.2	24.4	233	109
Marzo 2010	28.8	21.2	24.9	72	148
Abril 2010	29.4	22.6	26.0	80	134
Junio 2010	30.0	23.3	26.5	162	139
Julio 2010	30.0	23.6	26.7	345	126
Agosto 2010	30.7	23.7	27.2	64	139

Las poblaciones fueron derivadas de cruces entre líneas que tienen diferentes niveles de tolerancia a baja fertilidad del suelo, resistencia al BCMV, BCMNV y BGYMV y otras características de valor económico (Cuadro 2). Los progenitores se sembraron en enero de 2008 en los invernaderos en el Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico donde se realizaron los cruzamientos. Las plantas F_1 se sembraron en la Subestación de Isabela en octubre de 2008. La generación F_2 se sembró en la Subestación de Isabela en febrero de 2009 (Cuadro 2). Se seleccionaron plantas individuales basado en características agronómicas (porte erecto y buena carga de vainas) y grano comercial (negro, blanco y rojo pequeño). Las líneas $F_{2:3}$ seleccionadas fueron sembradas en la Subestación de Isabela en junio de 2009 en ensayos de evaluación para tolerancia a baja disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

Antes de sembrar los ensayos, se tomaron muestras de suelo para medir el pH y la disponibilidad de nutrientes en el predio, estas muestras se mandaron para evaluación a laboratorios en EU. Se usó un diseño en bloques completos aleatorizados con 3 replicaciones. La unidad experimental fue de un solo surco de 1 m sembrada con 10 semillas y la distancia entre surcos fue de 0.76 m. Los ensayos de campo fueron trabajados utilizando las prácticas recomendadas en la Guía Práctica para la Producción de Habichuela (Beaver et al., 2009). Se aplicaron 20 kg/ha de N a la plantación con un fertilizante para hortalizas 14-14-14. No se realizó aplicación de inóculo de *Rhizobium* en este campo, pero este había sido inoculado durante el año anterior con *Rhizobium etli*.

Cada población fue tratada como un experimento separado. Las variables medidas fueron el número de plantas cosechadas, rendimiento de semilla y peso de 100 semillas.

Además, al momento de la siembra, se aplicó a la semilla dentro del surco de todos los ensayos Captan líquido a una dosis de 15 mL por cada 3.8L para asegurar una buena germinación.

Los resultados de los ensayos fueron analizados utilizando un Análisis de Varianza. Los promedios de las características fueron comparados utilizando Diferencias Mínimas Significativas ($P < 0.05$).

Se realizó otra evaluación de las mismas líneas F_{2:3} en la Estación Experimental de Isabela de TARS-USDA-ARS sembrada en junio de 2009. El sitio experimental utilizado además de tener un bajo nivel de N en el suelo (2 ppm), tiene historia de alta incidencia de pudrición de raíz ocasionada por *Rhizoctonia*, además de otros patógenos como *Macrophomina* y *Fusarium solani*. Se uso un diseño en bloques completos aleatorizados con 2 repeticiones. La unidad experimental fue de un surco de 1 m sembrado con 12 semillas. Cada población fue tratada como un experimento separado, pero todos los experimentos compartieron los testigos PR0518-10, PR0401-257, PR0443-151 y 'Verano' los cuales poseen tolerancia a baja fertilidad o los genes de resistencia *bgm*, *I* y *bc3*. La distancia entre los surcos fue 0.76 m. Las semillas de todos los ensayos fueron tratadas con Captan en el surco antes de sembrarse para asegurar una buena germinación.

Las características medidas fueron emergencia de las plantas a los 7 días, vigor de la planta a los 30 días después de la siembra (utilizando la escala 1-9) (CIAT, 1987). Se realizó una evaluación de enfermedades foliares (bacteriosis, virus) tomada a los 60 días después de la siembra basado en una escala (1-9) (CIAT, 1987) en donde (1-2) resistente,

(3-4) tolerante, (5-6) medianamente tolerante, (7-8) medianamente susceptible y (9) susceptible, días de maduración, una evaluación de severidad (1-9)(CIAT, 1987) de pudrición de las raíces tomada el momento de la cosecha (R8) donde 1 es sin síntomas visibles y 9 con el 75% del tejido de la raíz con lesiones. Adicionalmente se evaluó nodulación utilizando la escala del CIAT, 1987 (1-9) de la raíces en la que 1 es ≥ 80 nódulos/planta y 9 < 10 nódulos/planta (Cuadros 5-7). También se colectaron datos de número de plantas cosechadas, rendimiento de semilla y peso de 100 semillas. Las escalas de evaluación de enfermedades foliares (bacteriosis) y de pudrición de raíz fueron basadas en el Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol (CIAT, 1987).

Para las evaluaciones de pudrición de raíz se seleccionó de dos a tres plantas al azar de cada línea y se evaluó visualmente el estado de las raíces (Cuadro 5). La nodulación de las raíces se midió tomando de dos a tres plantas de cada línea, se estimó la cantidad de nódulos se promedió y se adjudicó la evaluación de acuerdo a la escala del CIAT explicadas arriba (Cuadro 6). En el caso del vigor de la planta y enfermedades foliares como bacteriosis se observó cada línea de forma general y se empleó una escala desarrollada por el CIAT. (Cuadro 7).

Cuadro 2. Listado de poblaciones F₂ sembradas en la Subestación de Isabela en febrero de 2009.

Población	Características de los progenitores
PR0003-124 / Raven // GH0804-11B /// PR0443-162 / PR0401-257	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Arc1</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo.
PR0443-151 / BelMiDak RMR 10 // PR0443-151 / PR0401-259	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo.
PR0340-3-3-1 / PR0518-10	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo
PR0340-3-3-1 / PR0401-277	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo.
PR0340-3-3-1 / PR00301-181	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Tolerancia a baja fertilidad del suelo.
A774 / PR0340-3-3-1	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Tolerancia a baja fertilidad del suelo.
XRAV 117-2 / PR0401-277	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo.
PR0518-10 /// Verano // PR0003-124 / Raven	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Resistencia a la bacteriosis común, antracnosis y tolerancia a baja fertilidad del suelo.
ALS 9951-101-R // PR0443-151 / BelMiDak RMR 12	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mancha angular y tolerancia a baja fertilidad del suelo
ALS 9951-101-R / PR0340-3-3-1	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mancha angular y tolerancia a baja fertilidad del suelo
ALS 9951-101-R / PR00301-181	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mancha angular y tolerancia a baja fertilidad del suelo
PR0401-277 // PR0443-151 / BelMiDak RMR 12	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> , <i>Ur-11</i> , <i>Ur-4</i> . Resistencia a la mustia hilachosa y tolerancia a baja fertilidad del suelo
Verano // PR0443-151 / BelMiDak RMR 10	Los genes <i>bgm</i> , <i>I</i> , <i>bc3</i> . Resistencia a la bacteriosis común, roya y tolerancia a baja fertilidad del suelo.

Cuadro 3. Ensayos sembradas en Junio 2009 en el campo para evaluación para tolerancia a baja fertilidad de suelo y resistencia a pudrición de la raíz.

Poblaciones	Pedigrí	Número de líneas F _{2,3} evaluadas
0951	PR0518-10 / PR0401-257	100
0952	PR0003-124 / RAVEN// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257	21
0953	PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259	17
0954	PR0340-3-3-1/PR0518-10	27
0955	XRAV-117-2/PR0401-277	21
0956	PR0518-10///VERANO//PR0003-124/RAVEN	128
0957	ALS 9951-101-R/PR0443-151	20
0958	ALS 9951-101-R/PR0443-151/BMD RMR 12	29
0959	ALS 9951-101-R/BENIQUEZ	18
0960	PR0401-277//PR0443-151/BMD RMR 12	18
0961	VERANO//PRO443-151/BMD RMR 10	43
0962	PR0775-66-3///PR0003-124/RAVEN//GH0804-11B	20
0950		84
VIDAC Negro		44

Cuadro 4. Escala de evaluación del CIAT para pudrición de raíz¹.

Escala	Evaluación
1	Sin síntomas visibles
3	Decoloración ligera
5	25% del tejido de la raíz con lesiones
7	50% del tejido de la raíz con lesiones
9	75% del tejido de la raíz con lesiones

¹ CIAT, 19887

Cuadro 5. Escala de evaluación del CIAT para nodulación¹.

Escala	Evaluación
1	Excelente- más de 80 nódulos
3	Buena- 41-80
5	Intermedia- 21-40
7	Pobre- 10-20
9	Muy pobre- menos de 10

¹ CIAT, 1987

Cuadro 6. Escala de evaluación del CIAT para vigor de la planta¹.

Escala	Evaluación
1	Excelente
3	Bueno
5	Intermedio
7	Pobre
9	Muy pobre

¹ CIAT, 1987

Cuadro 7. Escala de evaluación del CIAT para enfermedades foliares¹.

Escala	Evaluación
1-2	Resistente
3-4	Tolerante
5-6	Medianamente Tolerante
7-8	Medianamente Susceptible
9	Susceptible

¹ CIAT, 1987

Las líneas F₄ de las dos poblaciones con comportamiento sobresaliente en los dos ensayos F_{2:3} fueron evaluadas en un suelo bajo en N y en el invernadero para reacción a BCMNV utilizando inoculaciones mecánicas con la sepa NL3 (Cuadro 9) para identificar la presencia del gen *I*. Las líneas con resistencia al BCMV y/o BCMNV fueron evaluadas con el marcador molecular SR-2 para identificar la presencia del gen *bgm* que confiere resistencia a BGYMV.

Los ensayos de las líneas F₄ fueron sembrados en la Subestación de Isabela en febrero de 2010. Cada población fue tratada como un experimento separado. Se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con 6 repeticiones. La unidad experimental fue un surco de 5 m donde se sembró 65 semillas. El espaciamiento entre los surcos fue de 0.76 cm. Después de la germinación, 3 m de cada unidad experimental fue marcada para las evaluaciones de las características agronómicas y la estimación de rendimiento de semilla. Un metro lineal de cada unidad experimental fue utilizado para la evaluación de nodulación y pudrición radicular aproximadamente 45 días después de la siembra. Se utilizó los mismos métodos descritos anteriormente para evaluar nodulación y pudrición de las raíces. Se utilizaron 6 replicaciones para estimar el rendimiento de semilla. La sexta replicación de cada población también fue utilizada para realizar la selección de plantas F_{4:5} individuales.

Cuadro 8. Lista de las entradas en el ensayo de líneas F₄ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembradas en la Subestación de Isabela Puerto Rico en Febrero 2010.

Línea	Fuente de semilla	Pedigrí
1038-1	0951-2	PR0518-10 / PR0401-257
1038-2	4	
1038-3	8	
1038-4	10	
1038-5	11	
1038-6	12	
1038-7	14	
1038-8	17	
1038-9	26	
1038-10	33	
1038-11	34	
1038-12	38	
1038-13	45	
1038-14	70	
1038-15	71	
1038-16	73	
1038-17	74	
1038-18	77	
1038-19	81	
1038-20	82	
1038-21	83	
1038-22	84	
1038-23	86	
1038-24	87	
1038-25	89	
1038-26	98	
1038-27	152	
1038-28	IBC 301-204	Testigo
1038-29	IBC 302-29	Testigo
1038-30	MDSX 14797-6-1	Testigo
1038-31	SX 14825-7-1	Testigo
1038-32	PR0518-10	Testigo
1038-33	PR0401-257	Testigo
1038-34	Verano	Testigo
1038-35	PR0443-151	Testigo

Cuadro 9. Lista de las entradas en el ensayo de líneas F₄ de la población PR0518-10///VERANO//PR0003-124/RAVEN sembradas en la Subestación de Isabela Puerto Rico en Febrero 2010.

Línea	Fuente de semilla	Pedigrí
1039-1	0956-6	PR0518-10///VERANO//PR0003-124/Raven
1039-2	9	
1039-3	18	
1039-4	27	
1039-5	34	
1039-6	37	
1039-7	46	
1039-8	47	
1039-9	49	
1039-10	50	
1039-11	61-N	
1039-12	62	
1039-13	68	
1039-14	69	
1039-15	82	
1039-16	84	
1039-17	85	
1039-18	86	
1039-19	87-N	
1039-20	90-N	
1039-21	95	
1039-22	126	
1039-23	160	
1039-24	178-N	
1039-25	181-N	
1039-26	199-B	
1039-27	199-N	
1039-28	282	
1039-29	308-B	
1039-30	308-N	
1039-31	IBC 301-204	Testigo
1039-32	IBC 302-29	Testigo
1039-33	MDSX 14797-6-1	Testigo
1039-34	SX 14825-7-1	Testigo
1039-35	PR0518-10	Testigo

1039-36	PR0401-257	Testigo
1039-37	Verano	Testigo
1039-38	PR0443-151	Testigo
1039-39	Amadeus 77	Testigo

Las líneas F_{4;5} con el mejor comportamiento en los ensayos sembradas en febrero de 2010 se sembraron en Junio 2010 en el mismo campo experimental utilizando los mismos métodos de la siembra anterior con excepción de que se seleccionó 1 m para evaluación de características agronómicas y la estimación de rendimiento de semilla ya que el resto del área se utilizó para las evaluaciones de pudrición de raíz, nodulación y selecciones de plantas (Cuadros 11-12). Las características medidas en el campo fueron analizadas usando ANOVA con comparaciones de medias usando pruebas de DMS con un nivel de significancia de 0.05.

Cuadro 10. Lista de las líneas más prometedoras obtenidas de la población PR0518-10 / PR0401-257 evaluadas para rendimiento y resistencia a BCMV y BGYMV en Junio 2010.

Línea	Fuente de semilla	Identidad
1044-1	1038-1	PR0951-2
1044-2	2	4
1044-3	5	11
1044-4	13	45
1044-5	14	70
1044-6	19	81
1044-7	20	82
1044-8	21	83
1044-9	22	84
1044-10	25	89
1044-11	26	98
1044-12	28	IBC-301-204

1044-13	29	IBC-302-29
1044-14	30	MDSX-14797-6-1
1044-15	31	SX-14825-7-1
1044-16	32	PR0518-10
1044-17	33	PR0401-257
1044-18	34	VERANO
1044-19	35	PR0443-151

Cuadro 11. Lista de las líneas más prometedoras obtenidas de la población PR0518-10//VERANO//PR0003-124/RAVEN evaluadas para rendimiento y resistencia a BCMV y BGYMV en Junio 2010.

Línea	Fuente	Identidad
1045-1	1039-8	PR0956-47
1045-2	13	68
1045-3	19	87-N
1045-4	20	90-N
1045-5	22	126
1045-6	23	160
1045-7	24	178-N
1045-8	25	181-N
1045-9	27	199-N
1045-10	28	282
1045-11	31	IBC-301-204
1045-12	32	IBC-302-29
1045-13	33	MDSX-14797-6-1
1045-14	34	SX-14825-7-1
1045-15	35	PR0518-10
1045-16	36	PR0401-257
1045-17	37	VERANO
1045-18	38	PR0443-151
1045-19	39	AMADEUS 77

Las líneas F_{4,5} más sobresalientes fueron evaluadas en el invernadero para su reacción a la cepa NL3 de BCMNV y para la presencia de los marcadores SR-2 y SW13 para los genes de resistencia al BGYMV y BCMV. Se utilizó para las evaluaciones del virus en el invernadero el procedimiento de inoculación artificial establecido por el CIAT con algunas modificaciones (Morales, 1987). Plantas de PR0443-151 infectadas con el virus BCMNV fueron utilizadas como fuente de inóculo para las inoculaciones. Se colectaron aproximadamente 10g de tejido vegetal (hojas) de las plantas infectadas, luego en un mortero se colocó el tejido junto con una pizca de arena sílica. Una vez en el mortero se aplicó 20 mL de buffer el cual se preparó según establecido por Michigan State University (2010) y se procedió a macerar la muestra hasta que se obtuviera todo el extracto. El mortero se mantuvo frío al igual que el extracto con el virus. La cantidad de tejido vegetal necesario para la inoculación dependió de la cantidad de plantas a inocularse. Una vez se llevó a cabo la inoculación mecánica se le aplicó una pequeña cantidad de carborundum a la suspensión de savia y con un hisopo se frotó la suspensión sobre la superficie de la hoja. La función del carborundum es que al rasparse la hoja con el hisopo le cause daño mecánico a la planta. Luego de la inoculación, las plántulas se colocaron en un lugar donde no hay radiación solar directa y de temperatura moderada (25⁰C) durante las primeras 24 horas. Después del primer día, las plantas se colocaron a pleno sol y a una temperatura promedio $\geq 30^0\text{C}$ durante el día. Las plántulas se inocularon en los primeros 7-10 días luego de la germinación. Aquellas plantas que presentaron la reacción de hipersensibilidad (puntos necróticos en la hoja) son las que poseen el gen *I*. Las susceptibles presentan mosaico y amarillamiento en las hojas.

El marcador molecular SCAR SR-2 fue utilizado para detectar el gen *bgm-1*. Se llevó a cabo extracción de ADN de plántulas de habichuela utilizando el primer trifolio que desarrollaron. En el plato provisto por el kit Qiagen de 96 muestras se recolectó aproximadamente 50 mg del material vegetativo y se colocó en los microtubos del plato. Luego de recolectado los trifolios de las plántulas en el plato de extracción, se combinó 45 mL AP1, 112.5 μ L Rnase A, y 112.5 μ L DX en un envase aparte. Se añadió 395 μ L de la mezcla y bolitas de acero inoxidable en cada microtubo. Una vez preparado el plato se colocó en el Mixer Mill 300 (Retsch GmbH, Germany) por 1.5 min. a 30Hz para triturar las muestras, después se rotó el plato en la máquina y se dejó triturando por 1.5 min adicionales. Luego de terminar el proceso de trituración se removió los platos y se colocaron en el centrifugador a 2000RPM para secar las tapas. Las tapas fueron descartadas y se añadió 130 μ L de AP2 en cada orificio. Una vez colocadas las nuevas tapas de cada microtubo se cubre el plato y se agitó vigorosamente por 15 seg. Los platos luego se colocaron en el centrifugador a 2000RPM y se incubó las muestras a -20° C por 10 min. Finalizado el periodo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 5050 xG por 8 min. Una vez centrifugadas las muestras se descartó las tapas y se transfirió 400 μ L del sobrenadante sin perturbar las partículas a un nuevo set platos, 1.5 vol. (600 μ L) de AP3/E fueron añadidos en cada hueco y se colocaron nuevas tapas. Los platos fueron agitados nuevamente de manera vigorosa por 15s y luego se secó en el centrifugador. El plato Dneasy de 96 muestras fue colocado sobre el S-Blocks y se transfirió 1 mL de las muestras a este nuevo plato. Después de la transferencia se cubrió el plato Dneasy con la cinta AirPore y fue centrifugado a 5050 xG por 6 min. La cinta fue removida y se

descartó los residuos del S-Block, luego de colocado nuevamente el plato en el S-Block se añadió 800 μL de AW y se cubrió otra vez con una cinta AirPore nueva y fue centrifugado a 5050 xG por 15 min. Finalmente se removió la cinta, se procedió a eluir el ADN en los tubos de elución añadiendo 100 μL de AE. Se cubrió el plato con la cinta AirPore y fue incubado por 1 min a temperatura ambiente; al final de la incubación se centrifugó a 5050 x Gigahertz por 2 minutos. Este paso de elución del ADN se repitió nuevamente y luego de centrifugado fue almacenado en el congelador a -20°C .

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la técnica de Polimerase Chain Reaction (PCR). Una vez llevada a cabo la dilución en 50 μL del extracto de ADN crudo se procedió a preparar los platos para los termocicladores. En cada espacio provisto en el microplato se agrego 2 μL de ADN y 23 μL de la mezcla de PCR. La mezcla de PCR contenía los siguientes componentes: PCR buffer (5X), dntp mix (10.0mM), MgCl_2 (25mM), F-primer (10 μL), R-Primer (10 μL), Taq (5 unit/ μL), HPLC H_2O y ADN (10ng/ μL). Cada placa posee 96 espacios para las muestras, se calculó el volumen final para 110 reacciones siendo el total 2760 mL. De solución de PCR por microplato. Una vez agregado el ADN y la solución de PCR al microplato se llevaron las mismas al termociclador para realizar la amplificación de las bandas del marcador SR-2

Programación del termociclador para el marcador SCAR SR-2

34 ciclos de 10s a 94°C

40s a 65°C

120s a 72°C

1 ciclo de 5 minutos a 72°C

La duración aproximada del programa es de 2 horas y media.

Una vez terminado la amplificación de las bandas de bgm-1 se procedió a preparar el gel de agarosa siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se preparó un gel de agarosa con 1x TBE, con 1.5 gramos de agarosa y 15 μ L Sybr Safe.
- b. Se dejó enfriar y se vertió en la cubeta de electroforesis y se dejó reposar por 30 minutos.
- c. Ésta cubeta se colocó en la cámara de electroforesis la cual contenía buffer de corrida TBE 1x.
- d. Luego se sembró en cada pozo del gel 12 μ L de reacción dejando espacios al principio y al centro para sembrar la escalera.
- e. Se conectó el aparato de electroforesis a la fuente de corriente dejando correr las bandas sobre el gel a 100 voltios por 2 horas.

Finalmente se visualizó el gel en la cámara de luz ultravioleta para verificar la presencia de las bandas y se tomaron las fotos. El SCAR SR-2 tiene dos bandas; la banda para bgm-1 se encuentra a 530 pares de bases (pb) y expresa resistencia, mientras que para Bgm-1 se encuentran a 570 pares de bases (pb) y expresa susceptibilidad (Alvarado, 2009).

Resultados y Discusión

Las evaluaciones del VIDAC Negro y las líneas F₃ de las 12 poblaciones para nodulación, pudrición de raíz y rendimiento se llevaron a cabo en la Subestación de Isabela de la Universidad de Puerto Rico y la Estación Federal TARS-USDA-ARS. Muestras de suelo fueron recolectadas al azar en las dos localidades en donde se llevaron a cabo los dos experimentos en Junio de 2009. Los análisis químicos de suelo mostraron que en la Estación Federal TARS-USDA-ARS el contenido de N disponible (2 ppm) fue bajo y el porcentaje de materia orgánica fue mediano, mientras que en la Subestación de Isabela de la Universidad de Puerto Rico el contenido de N (7 ppm) fue más alto que en TARS pero sigue considerándose bajo, mientras que el porcentaje de materia orgánica fue intermedio (Cuadro 12). El pH y los niveles de P y K en los suelos de estos campos experimentales no fueron limitantes para la producción de habichuela (Sotomayor, 2010). Estos suelos fueron apropiados para estudios de adaptación de habichuela a suelos con bajos niveles de N. La mayoría de los agricultores en Latinoamérica utilizan suelos marginales que poseen contenidos bajos de N que reduce la productividad y la rentabilidad del cultivo (Rosas et al. 2003).

Cuadro 12. Análisis de suelos de los predios en la Estación de Isabela de la Universidad de Puerto Rico y la Estación Federal (TARS).

	TARS- Estación Experimental Federal en Isabela	Subestación Experimental de Isabela	
Valores	junio de 2008	junio de 2008	junio de 2009.
% MO	3.6	4.1	3.8
N ppm	2	7	6
Bray 1 P ppm	20.61	32.38	17.89
K ppm	114	139	128
Mg ppm	94	99	88
Ca ppm	1579	1793	1334
S ppm	22	21	33
Zn ppm	1	0.8	1.2
Mn ppm	37.2	14.7	33.2
Cu ppm	4.1	1.8	4.2
Fe ppm	12.9	10.4	20.7
B ppm	0.2	0.2	0.4
pH	6.5	6.7	6.2
Sales solubles	0.21	0.24	0.26
Na ppm	16	24	18
% K	3	3.5	3.5
% Mg	8	8	7.8
% Ca	80.2	87.5	70.9
% Na	0.7	1	0.8
% H	8.1	0	17
CEC	9.8	10.3	9.4

El vivero “VIDAC Negro” incluyó líneas prometedoras de habichuela de color negro provenientes de los programas de mejoramiento de Centroamérica y Puerto Rico. Hubo diferencias significativas entre líneas para rendimiento de semilla en el ensayo en la Subestación de Isabela (SI) (Cuadro13). No se detectaron diferencias significativas entre líneas sembradas en la Subestación de TARS (ST). Los rendimientos promedios en las dos localidades fueron < 1,000 kg/ha, lo que sugiere que la deficiencia de N y las

podriciones de raíz limitaron la productividad de estas líneas (Cuadro 14). Se esperaba obtener líneas con rendimientos promedios mayores a los 1,000 kg/ha. La línea con el mejor comportamiento en ambas localidades fue el testigo PR0443-151, esta línea fue seleccionada previamente por tolerancia a baja fertilidad y resistencia a pudrición de raíz. La línea RBF-20-86 produjo rendimientos promedios > 1,000 kg/ha en ambas localidades. Esta línea fue seleccionada en Honduras para tolerancia a suelos de baja fertilidad. Las líneas restantes en el ensayo produjeron bajos rendimientos. Estos resultados demuestran la necesidad de desarrollar líneas con mejor adaptación a los suelos de baja fertilidad y con tolerancia a pudrición de raíz.

Cuadro 13. Tabla de análisis de varianza del vivero “VIDAC Negro” sembrado en la Subestación de Isabela Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación de Isabela		Rendimiento de semilla TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado Medio
Bloque	2	1750266	1	319566
Línea	43	477559	43	292986
Error	86	111709	43	143246

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 14. Rendimientos promedio de líneas del VIDAC Negro sembradas en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Identificación	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) en la Estación Federal de Isabela, TARS
X02-33-157	1428	901
RBF 20-86	1012	1384
SEQ 344-11	1012	525
SEQ 344-102	895	534
SEQ 344-67	845	776

PR0333-104	834	850
SEQ 344-21	711	659
MN 14059-7	706	600
SEQ 342-85	695	1234
SEQ 344-67	683	709
MHN 322-4	667	817
SEQ 342-39	661	1167
X02-33-159-1	617	942
RBF 7-25	595	742
SEQ 344-69	589	1301
SEQ 342-53	572	826
XRAV-117-2	567	775
SEQ 342-74	511	992
SEQ 344-110	478	1126
SEQ 344-13	472	884
SEQ 344-24	467	726
TCFF2-12-3-11-2	459	0
SEQ 342-86	450	517
MHN 320-75	439	242
XRAV 96-11	411	934
X02-33-161	406	517
X02-33-163-1	400	467
XRAV-40-4	394	0
SEQ 344-26	389	592
SEQ 342-71	339	792
SEQ 344-22	311	383
MEN 2201-64	261	550
SEQ 345-22	250	776
SEQ 341-108	217	642
SEQ 341-99	205	1509
SEQ 344-14	192	609
SEQ 345-36	150	834
SEQ 341-55	128	1234
PR0443-151	1327	1314
Media	657	840
DMS (0.05)	559	NS
CV(%)	54.4	45.0

El comportamiento de las líneas F₃ de la población PR0003-124 / Raven// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257 fue mejor que las líneas en el VIDAC Negro.

Aunque no se detectó diferencias significativas en rendimiento, siete líneas produjeron rendimientos promedios > 1,000 kg/ha en ambas localidades (Cuadro 16).

Cuadro 15. Tabla de análisis de varianza de la población PR0003-124 / Raven// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación de Isabela		Rendimiento de semilla TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado Medio
Bloque	2	1391345	1	111704
Línea	20	396035	20	385250
Error	40	242394	20	269448

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 16. Rendimientos promedios de líneas F₃ de la población PR0003-124 / Raven// GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Linea	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) en la Estación Federal de Isabela, TARS
0952-6	1762	1167
0952-17	1739	1492
0952-10	1672	1175
0952-8	1589	1167
0952-9	1373	1184
0952-19	1351	842
0952-12	1317	1534
0952-15	1267	909
0952-7	1256	592
0952-5	1217	792
0952-1	1139	1201

0952-11	1134	700
0952-4	1122	1259
0952-2	1011	567
0952-16	917	0
0952-14	795	592
0952-3	694	684
0952-18	650	317
0952-13	534	0
PR0518-10	1601	775
PR0401-257	1311	325
Media	1217	822
DMS(0.05)	NS	NS
CV(%)	40	63

Hubo diferencias significativas en rendimiento entre líneas F_3 la población PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 solamente en el ensayo sembrado en la ST (Cuadro 16). Apenas dos líneas produjeron rendimientos promedios $> 1,000$ kg/ha en ambas localidades (Cuadro 18). En contraste, el testigo PR0443-151 produjo rendimientos promedios $> 2,000$ kg/ha en ambas localidades.

Cuadro 17. Tabla de análisis de varianza de la población PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación de Isabela		Rendimiento de semilla TARS	
	g.l.	Cuadrado Medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	2	761445	1	622624
Línea	16	239872	16	559559
Error	32	528831	16	144936

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 18. Rendimientos promedios de líneas F₃ de la población PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Linea	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) en la Estación Federal de Isabela, TARS
0953-15	2184	509
0953-10	2023	634
0953-6	1972	1409
0953-13	1684	0
0953-11	1656	859
0953-7	1576	475
0953-1	1572	0
0953-12	1517	734
0953-9	1445	1150
0953-4	1361	975
0953-5	1334	617
0953-3	1211	334
0953-14	1206	0
0953-2	1150	734
0953-8	1111	825
PR0443-151	2292	2017
PR0401-259	1695	1184
Media	1561	732
DMS(0.05)	NS	761
CV(%)	3	52

No hubo diferencias significativas en rendimiento entre líneas F₃ de la población PR0340-3-3-1/PR0518-10 en las dos localidades (Cuadro 19). El rendimiento promedio de las líneas en la SI fue > 1,440 kg/ha (Cuadro 20). Sin embargo, las líneas fueron afectadas por la pudrición de raíz en la ST y el rendimiento promedio en esta localidad fue apenas 785 kg/ha. La línea PR0954-21 produjo rendimientos promedios > 1,200 kg/ha en las dos localidades.

Cuadro 19. Tabla de análisis de varianza de la población PR0340-3-3-1/PR0518-10 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación de Isabela		Rendimiento de semilla TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	2	529414	1	4021
Línea	26	354496	26	256324
Error	52	401537	26	386242

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 20. Rendimientos promedios de líneas F₃ de la población PR0340-3-3-1/PR0518-10 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Linea	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) en la Estación Federal de Isabela, TARS
0954-4	2493	817
0954-22	2112	1117
0954-1	2056	217
0954-24	1839	1059
0954-3	1756	367
0954-9	1606	1159
0954-14	1601	575
0954-18	1589	742
0954-10	1534	875
0954-12	1506	867
0954-5	1478	192
0954-2	1359	667
0954-13	1339	684
0954-23	1339	867
0954-20	1334	0
0954-21	1333	1242
0954-6	1317	1017
0954-8	1311	684
0954-25	1261	709
0954-11	1250	1142

0954-19	1161	884
0954-7	1072	1075
0954-15	1006	559
0954-16	978	825
0954-17	973	942
P0340-3-3-1	956	317
PR0518-10	1675	1592
Media	1436	785
DMS(0.05)	NS	NS
CV(%)	33	79

No hubo diferencias significativas en rendimiento entre líneas F_3 de la población XRAV-117-2/PR0401-277 en la localidad de la SI (Cuadro 21). Solo tres líneas tuvieron rendimientos promedios de $1,000 \text{ kg ha}^{-1}$ en ambas localidades. PR0955-6 produjo rendimientos promedios $> 1,528 \text{ kg/ha}$ en la Subestación de Isabela mientras que PR0955-12 produjo rendimientos promedio de $1,592 \text{ kg/ha}$ en ST (Cuadro 22).

Cuadro 21. Tabla de análisis de varianza de la población XRAV-117-2/PR0401-277 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación de Isabela		Rendimiento de semilla TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	2	215920	1	437007
Línea	20	340127	20	234644
Error	40	279172	20	89145

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 22. Rendimientos promedio de líneas F₃ de la población XRAV-117-2/PR0401-277 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Linea	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) en la Estación Federal de Isabela, TARS
0955-6	1528	1000
0955-2	1517	767
0955-10	1459	575
0955-17	1375	825
0955-14	1373	1050
0955-19	1334	392
0955-3	1311	783
0955-15	1267	533
0955-8	1250	617
0955-1	1228	850
0955-11	1150	984
0955-4	1106	1059
0955-5	1022	600
0955-16	1017	717
0955-12	950	1592
0955-9	817	375
0955-18	817	1000
0955-13	700	892
0955-7	633	575
PR0518-10	1100	1392
PR0401-277	472	83
Media	1119	793
DMS(0.05)	NS	1216
CV(%)	36	38

El comportamiento de las líneas de las diferentes poblaciones fueron evaluadas en los ensayos sembrados en junio de 2009. De las 12 poblaciones evaluadas solo dos tuvieron comportamiento sobresaliente en los ensayos. Las otras 10 poblaciones evaluadas se descartaron por diversas razones: las poblaciones derivadas de los cruzamientos (ALS 9951-101-R/PR0443-151, ALS 9951-101-R/PR0443-151/BMD

RMR 12, ALS 9951-101-R/BENIQUEZ, PR0401-277//PR0443-151/BMD RMR 12, VERANO//PRO443-151/BMD RMR 10, PR0775-66-3//PR0003-124/RAVEN//GH0804-11B) (Cuadro 3) fueron afectadas por bacteriosis causada por *Xanthomonas axonopodis* y debido a la severidad el vigor de las líneas fue bajo. En el caso de las poblaciones derivadas de los cruzamientos (PR0003-124 / RAVEN//GH0804-11B//PR0518-10/PR0401-257, PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259, PR0340-3-3-1/PR0518-10, XRAV-117-2/PR0401-277) (Cuadro 3) no se detectó diferencias significativas entre las líneas de las diferentes poblaciones en la SI por tal razón se descartaron para evaluaciones adicionales (Cuadros 13-22). Se encontraron diferencias significativas en rendimiento en la ST para las poblaciones PR0443-151/BMD RMR 10//PR0443-151/PR0401-259 y XRAV-117-2/PR0401-277 pero las características agronómicas en las líneas F₃ fueron, en general, inferiores. Sin embargo, se seleccionó plantas individuales de unas pocas líneas prometedoras de cada población para evaluaciones adicionales.

Las dos poblaciones que tuvieron comportamiento sobresaliente fueron las líneas F₃ derivadas de los cruzamientos (PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10//VERANO//PR0003-124/RAVEN). Se encontraron diferencias significativas en rendimiento entre las líneas F₃. En los (cuadros 23 y 25) se muestra el análisis de varianza realizado a estas dos poblaciones. Ocho líneas F₃ de la población PR0518-10 / PR0401-257 produjeron rendimiento promedios > 2,000 kg/ha en la SI y rendimiento promedios ≥ 1,200 kg/ha en la ST que representó un comportamiento similar al testigo PR0518-10 (Cuadro 24). Las plantas de las líneas sobresalientes mostraron un buen vigor durante el

periodo de crecimiento vegetativo. Sin embargo, no observamos una relación entre lecturas de nodulación y pudrición de raíz con el rendimiento de las líneas (Cuadro 24). Dorcinvil et al. (2010) identificó que la línea PR0518-10, fue eficiente en la adquisición y utilización de N.

Los rendimientos de las líneas F₃ de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven no fueron tan buenos como las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257 (Cuadro 26). Sin embargo, tres líneas produjeron rendimientos promedios > 1,700 kg/ha en la SI y > 1,000 kg/ha en la ST. La nodulación de las líneas de esta población no fue buena posiblemente a una baja población de rhizobium en el suelo. Acuña y Ramírez, 1986 establecen que investigaciones realizadas con fungicidas como en el caso del Captan afectan negativamente las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno. Por lo que la desinfección que se realizó a los ensayos con Captan pudieron haber influido en la pobre nodulación de las plantas. Sin embargo, esta población tuvo menos daño causado por pudrición de raíz (Cuadro 26).

Cuadro 23. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación Isabela		Rendimiento de semilla TARS		Lectura de nodulación tras		Lectura de pudrición de raíz TARS	
	g.l.	Cuadrado Medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado o medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	2	1649504	1	66686	1	1.44	1	0.72
Línea	99	614874	99	505276	99	0.28	99	0.80
Error	198	384859	99	92512	99	0.27	99	0.75

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 24. Rendimientos, lecturas de nodulación y por ciento de plantas con pudrición de líneas F₃ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Línea	Rendimiento promedio de semilla (kg/ha) en la Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento promedio de semilla (kg/ha) y (rango) en la Estación Federal de Isabela, TARS	Lectura promedio de nodulación en la Estación Federal de Isabela, TARS ¹	Por ciento promedio de plantas con pudrición de raíz en la Estación Federal de Isabela, TARS ²
PR0951-97	2956	1617 (2)	9.0	37.5
PR0951-77	2773	1284 (15)	9.0	25.0
PR0951-85	2695	1417 (10)	8.5	12.5
PR0951-84	2645	700 (46)	9.0	12.5
PR0951-87	2628	1450 (8)	9.0	50.0
PR0951-45	2456	750 (40)	8.5	25.0
PR0951-73	2384	1217 (19)	9.0	25.0
PR0951-27	2350	225 (71)	8.5	25.0
PR0951-83	2256	1384 (11)	9.0	25.0
PR0951-70	2217	1167 (22)	9.0	0.0
PR0951-34	2206	567 (51)	8.5	0.0
PR0951-81	2195	1350 (13)	9.0	25.0
PR0951-89	2150	742 (42)	9.0	0.0
PR0951-82	2117	1367 (12)	9.0	62.5
PR0951-4	2112	67 (79)	9.0	12.5
PR0951-74	2056	1234 (18)	8.5	12.5
PR0951-98	2034	1634 (1)	8.5	37.5
PR0951-11	2028	92 (78)	9.0	25.0
PR0951-16	2023	267 (68)	9.0	0.0
PR0951-72	2022	1200 (20)	9.0	25.0
PR0951-33	2006	550 (52)	8.5	25.0
PR0951-8	1995	133 (76)	9.0	25.0
PR0951-14	1967	233 (70)	8.0	25.0
PR0951-86	1967	1434 (9)	8.5	25.0
PR0951-2	1962	33 (82)	8.0	25.0
PR0951-38	1945	633 (48)	8.5	12.5
PR0951-10	1878	167 (74)	8.5	25.0
PR0951-49	1878	817 (35)	8.5	25.0
PR0951-17	1867	283 (67)	8.0	37.5
PR0951-12	1850	0 (85)	9.0	0.0

PR0951-26	1839	433 (61)	9.0	25.0
PR0951-25	1834	209 (73)	9.0	12.5
PR0951-43	1834	0 (88)	9.0	0.0
PR0951-88	1833	734 (43)	9.0	12.5
PR0951-62	1828	1034 (28)	9.0	12.5
PR0951-71	1811	1184 (21)	8.0	75.0
PR0951-3	1806	50 (80)	9.0	50.0
PR0951-67	1784	1117 (24)	8.0	25.0
PR0951-95	1767	1584 (4)	9.0	50.0
PR0951-66	1756	1100 (25)	9.0	12.5
PR0951-56	1739	934 (32)	8.5	25.0
PR0951-52	1734	434 (60)	9.0	12.5
PR0951-76	1734	1267 (16)	8.0	50.0
PR0951-7	1706	117 (77)	8.5	25.0
PR0951-51	1684	850 (34)	9.0	50.0
PR0951-30	1672	500 (55)	8.5	25.0
PR0951-65	1672	1084 (26)	8.5	37.5
PR0951-41	1661	683 (47)	9.0	12.5
PR0951-42	1656	700 (45)	8.5	37.5
PR0951-94	1639	1567 (5)	9.0	12.5
PR0951-92	1617	1534 (6)	8.0	37.5
PR0951-29	1589	483 (56)	8.0	25.0
PR0951-90	1584	750 (41)	9.0	25.0
PR0951-93	1584	775 (38)	9.0	0.0
PR0951-36	1567	600 (49)	9.0	12.5
PR0951-75	1556	1250 (17)	9.0	37.5
PR0951-54	1550	900 (33)	9.0	25.0
PR0951-32	1534	533 (53)	9.0	37.5
PR0951-9	1523	150 (75)	8.5	25.0
PR0951-31	1511	517 (54)	8.5	37.5
PR0951-35	1500	292 (66)	8.5	12.5
PR0951-78	1500	1300 (14)	9.0	25.0
PR0951-61	1478	1017 (29)	9.0	12.5
PR0951-15	1445	250 (69)	9.0	0.0
PR0951-37	1439	309 (65)	9.0	12.5
PR0951-48	1389	800 (36)	9.0	25.0
PR0951-1	1373	17 (83)	8.5	25.0
PR0951-6	1373	50 (81)	7.5	25.0
PR0951-46	1359	767 (39)	8.5	12.5

PR0951-57	1350	950 (31)	9.0	12.5
PR0951-91	1350	1517 (7)	9.0	50.0
PR0951-28	1345	467 (57)	9.0	25.0
PR0951-44	1342	733 (44)	8.0	12.5
PR0951-5	1295	0 (84)	8.0	25.0
PR0951-55	1223	459 (58)	9.0	25.0
PR0951-50	1211	0 (89)	9.0	25.0
PR0951-22	1206	0 (87)	8.5	12.5
PR0951-63	1184	0 (90)	8.5	12.5
PR0951-13	1173	217 (72)	9.0	12.5
PR0951-64	1167	1067 (27)	9.0	12.5
PR0951-47	1156	783 (37)	9.0	12.5
PR0951-58	1112	967 (30)	8.5	62.5
PR0951-24	1095	400 (62)	8.5	0.0
PR0951-21	1089	350 (64)	9.0	0.0
PR0951-18	1061	0 (86)	9.0	0.0
PR0951-69	1061	575 (50)	9.0	37.5
PR0951-68	1044	1134 (23)	9.0	62.5
PR0951-53	1028	442 (59)	9.0	25.0
PR0951-96	928	1600 (3)	8.0	12.5
PR0951-23	773	383 (63)	9.0	12.5
PR0518-10	1900	919	8.8	20.0
PR0401-257	1471	800	8.7	17.5
Media	1703	725	8.7	22.5
DMS (0.05)	963	1208	NS	NS
CV(%)	35.0	41.9	6.0	95.2

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

² Se evaluaron un total de cuatro plantas de habichuela de cada unidad experimental.

Cuadro 25. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación Isabela		Rendimiento de semilla TARS		Lectura de nodulación tras		Lectura de pudrición de raíz TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio

						Medio		medio
Bloque	2	2684221	1	102600	1	2.64	1	0.00
Línea	127	548309	127	213934	127	0.33	127	0.80
Error	254	217728	127	124299	127	0.38	127	0.83

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 26. Rendimientos, lecturas de nodulación y por ciento de plantas con pudrición de líneas F₃ de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Líneas	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Rendimiento de semilla (kg/ha) y rango en la Estación Federal de Isabela, TARS	Lectura promedio de nodulación en la Estación Federal de Isabela, TARS ¹	Por ciento promedio de plantas con pudrición de raíz en la Estación Federal de Isabela, TARS ²
PR0956-34	2223	1159 (12)	8.5	37.5
PR0956-18	2156	409 (89)	7.5	37.5
PR0956-32	2111	642 (65)	8.5	25
PR0956-68	2106	1092 (13)	8.0	50
PR0956-95	2006	951 (23)	9.0	37.5
PR0956-87	1906	617 (69)	8.5	50
PR0956-90	1906	951 (22)	9.0	50
PR0956-35	1861	967 (20)	8.0	37.5
PR0956-37	1828	350 (98)	8.0	37.5
PR0956-86	1817	842 (37)	9.0	37.5
PR0956-62	1795	842 (36)	8.5	50
PR0956-64	1778	867 (32)	8.0	37.5
PR0956-7	1739	951 (21)	8.5	37.5
PR0956-30	1734	1217 (7)	8.5	62.5
PR0956-84	1733	734 (52)	8.0	50
PR0956-3	1728	717 (54)	9.0	75
PR0956-126	1728	734 (53)	9.0	50
PR0956-10	1723	384 (94)	8.5	50
PR0956-9	1683	876 (30)	8.5	25
PR0956-46	1678	608 (70)	9.0	25
PR0956-69	1650	750 (49)	9.0	37.5
PR0956-6	1634	550 (75)	9.0	50
PR0956-27	1628	759 (48)	9.0	25

PR0956-24	1612	842 (35)	8.0	25
PR0956-49	1567	1217 (8)	8.5	37.5
PR0956-50	1561	667 (60)	8.5	25
PR0956-47	1528	834 (39)	9.0	12.5
PR0956-82	1528	634 (67)	9.0	50
PR0956-85	1528	825 (41)	8.5	37.5
PR0956-61	1523	867 (31)	8.5	50
PR0956-29	1506	1567 (1)	8.5	50
PR0956-78	1467	1292 (4)	8.5	25
PR0956-23	1461	650 (64)	8.5	62.5
PR0956-51	1445	584 (73)	9.0	25
PR0956-91	1439	1284 (5)	9.0	37.5
PR0956-92	1423	284 (104)	9.0	37.5
PR0956-25	1422	984 (19)	8.0	37.5
PR0956-93	1411	1067 (15)	8.5	50
PR0956-67	1389	809 (44)	8.0	25
PR0956-53	1384	534 (77)	9.0	37.5
PR0956-94	1384	1226 (6)	9.0	75
PR0956-72	1383	776 (46)	8.5	25
PR0956-2	1356	759 (47)	9.0	50
PR0956-48	1356	625 (68)	9.0	25
PR0956-31	1350	834 (38)	8.5	37.5
PR0956-58	1345	509 (80)	8.5	25
PR0956-12	1334	659 (61)	8.0	12.5
PR0956-123	1328	742 (51)	9.0	50
PR0956-11	1311	500 (81)	8.5	0
PR0956-5	1309	1009 (17)	8.5	37.5
PR0956-73	1306	884 (29)	9.0	37.5
PR0956-44	1300	342 (100)	8.5	37.5
PR0956-74	1295	1192 (11)	9.0	50
PR0956-33	1289	1192 (10)	7.5	50
PR0956-81	1284	492 (82)	9.0	50
PR0956-16	1273	692 (58)	8.0	50
PR0956-22	1256	142 (109)	9.0	12.5
PR0956-124	1256	467 (84)	9.0	37.5
PR0956-52	1250	834 (40)	9.0	50
PR0956-122	1239	1000 (18)	9.0	12.5

PR0956-8	1234	925 (25)	8.5	50
PR0956-101	1217	400 (92)	8.5	12.5
PR0956-36	1209	850 (34)	9.0	37.5
PR0956-1	1206	450 (86)	8.0	37.5
PR0956-55	1206	383 (95)	8.5	25
PR0956-89	1195	267 (106)	9.0	12.5
PR0956-17	1184	692 (59)	8.5	62.5
PR0956-125	1178	84 (111)	8.5	25
PR0956-28	1167	909 (26)	9.0	25
PR0956-14	1151	334 (102)	8.5	25
PR0956-4	1139	709 (56)	8.5	50
PR0956-43	1139	375 (97)	9.0	25
PR0956-88	1128	517 (79)	7.0	25
PR0956-105	1117	1350 (3)	9.0	25
PR0956-96	1106	534 (78)	9.0	25
PR0956-56	1095	350 (99)	9.0	37.5
PR0956-75	1078	300 (103)	8.5	50
PR0956-13	1045	400 (91)	8.0	37.5
PR0956-15	1045	867 (33)	8.5	37.5
PR0956-83	1039	717 (55)	9.0	25
PR0956-118	1011	942 (24)	9.0	62.5
PR0956-26	1000	809 (42)	8.5	37.5
PR0956-106	1000	1217 (9)	9.0	37.5
PR0956-77	989	1526 (2)	8.5	50
PR0956-54	984	809 (43)	8.0	25
PR0956-103	984	642 (66)	9.0	37.5
PR0956-117	978	417 (88)	9.0	25
PR0956-57	973	458 (85)	8.5	87.5
PR0956-21	950	592 (71)	9.0	25
PR0956-111	945	742 (50)	9.0	25
PR0956-71	939	1059 (16)	9.0	12.5
PR0956-42	911	375 (96)	9.0	25
PR0956-113	878	659 (62)	8.5	50
PR0956-63	850	658 (63)	9.0	37.5
PR0956-104	845	0 (116)	8.5	25
PR0956-116	844	346 (101)	8.0	12.5
PR0956-65	839	392 (93)	9.0	37.5

PR0956-41	822	584 (72)	9.0	25
PR0956-121	795	1076 (14)	9.0	50
PR0956-128	794	909 (27)	8.5	62.5
PR0956-97	767	576 (74)	8.5	50
PR0956-127	750	550 (76)	8.5	37.5
PR0956-45	739	59 (113)	8.5	0
PR0956-107	689	792 (45)	8.5	37.5
PR0956-76	622	225 (107)	9.0	25
PR0956-70	595	0 (114)	9.0	25
PR0956-110	594	700 (57)	8.5	25
PR0956-66	556	425 (87)	9.0	50
PR0956-112	528	408 (90)	9.0	25
PR0956-98	525	0 (115)	8.0	12.5
PR0956-108	505	167 (108)	9.0	0
PR0956-102	489	901 (28)	8.5	50
PR0956-109	483	275 (105)	9.0	12.5
PR0956-115	344	109 (110)	8.5	25
PR0956-114	272	467 (83)	8.5	75
PR0956-38	194	67 (112)	8.5	12.5
PR0518-10	1662	915	8.6	42.5
Verano	1137	506	8.8	50
Media	1254	685	8.6	1.5
DMS(0.05)	727	1400	NS	NS
CV(%)	37.7	51.5	7.2	62.9

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

² Se evaluaron un total de cuatro plantas de habichuela de cada unidad experimental.

En general, hubo de las líneas F₃ gran variabilidad en el rendimiento entre las poblaciones evaluadas (Cuadros14-26). Solo las dos poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///VERANO//PR0003-124/RAVEN mostraron, mejor tolerancia a baja fertilidad y pudrición de raíz, alto rendimiento, buena adaptación, características agronómicas y grano comercial. Líneas que se comportan bien en una siembra durante el verano en Puerto Rico normalmente tienen tolerancia al calor y, por lo menos, niveles

moderados de resistencia a bacteriosis común. La selección simultánea para varias características y la utilización de dos localidades sirvieron para identificar las poblaciones más prometedoras. Las líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven produjeron rendimientos comparables con los testigos como PR0518-10 y Verano. Los rendimientos de los ensayos llevados a cabo en la ST fueron menores que en la SI debido a que no se aplicó fertilización al suelo. Además, no se le aplicó fertilizante desde hace varios años en el predio donde se sembró. Pero los rendimientos fueron aceptables y comparables a los reportados por Cordero-García (1979) que obtuvieron rendimientos de 1,711 y 1,737 kg ha⁻¹ sin aplicar ninguna cantidad de N en el suelo.

Hubo correlación fenotípica significativa ($p < 0.05$) y positiva ($r = 0.17$) entre las medias de rendimiento en la ST y los valores de pudrición de raíz de las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257. No se encontró correlaciones fenotípicas entre las medias de rendimiento en la ST y los valores de nodulación y pudrición de raíz para la población PR0518-10 / PR0401-257

El segundo grupo de experimentos fue sembrado en Febrero 2010. De la población derivada de PR0518-10 / PR0401-257 (0951) fueron seleccionadas las 27 líneas con mejor rendimiento y en la población derivada de PR0518-10 / PR0401-257 (0956) se seleccionaron las 30 líneas con los mejores rendimientos (Cuadro 8-9). Se añadieron a estos dos nuevos ensayos líneas testigos que varían en tolerancia a baja fertilidad del suelo.

Se encontraron diferencias significativas entre las líneas de las dos poblaciones para las lecturas de nodulación. En los (cuadros 27 y 29) se muestran los análisis de varianza de estas poblaciones. IBC301-204 y PR1038-4 en el ensayo de la población PR0518-10 / PR0401-257 y PR1039-3 en el ensayo de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven produjeron los mayores números de nódulos. (Cuadros 28 y 30). El testigo IBC301-204 fue la línea con mejor nodulación a pesar que en el ensayo las plantas de esta línea no presentaron un buen vigor. Al contrario, la línea PR1038-4 tuvo el segundo mejor valor de nodulación y un valor de vigor de 1.67 (Cuadro 28).

De manera general se observó poca variabilidad entre las líneas de las lecturas de nodulación (Cuadro 28 y 30). No se encontraron diferencias significativas entre las líneas para las evaluaciones de pudrición de raíz de la población PR0518-10 / PR0401-257. Sin embargo, hubo diferencias significativas en lecturas de pudrición de raíz para la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven. Las líneas PR1039-14 y PR1039-17 tuvieron los niveles más bajos de severidad de pudrición de raíz (Cuadro 28 y 30).

Se encontró para la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven correlaciones significativas entre los promedios de nodulación y los promedios de pudrición de raíz ($r = 0.23$) y vigor de las plantas ($r = -0.15$). Los rendimientos de las líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembradas en febrero de 2010 fueron buenos pero menor que los rendimientos obtenidos en los ensayos sembradas en junio de 2009. Se encontraron dentro de las dos poblaciones diferencias significativas entre las líneas para rendimiento. Varias líneas

produjeron rendimientos $> 1,000 \text{ kg ha}^{-1}$ sin aplicación de N. Esto compara con los resultados de Fernández-Toledo (1996) que logró identificar líneas de habichuela en la SI con rendimientos mayores de $1,000 \text{ kg ha}^{-1}$ sin la aplicación de fertilización nitrogenada. A medida que se siembra en un mismo predio sin la aplicación de N al suelo los rendimientos tienden a decaer. Se encontraron líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven que tuvieron rendimientos comparables con las líneas testigos. Once líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257 y diez líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven produjeron rendimientos $> 1,000 \text{ kg ha}^{-1}$ (Cuadros 28 y 30)

Cuadro 27 Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en febrero de 2010.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación Isabela		Lectura de nodulación		Lectura de vigor		Lectura de pudrición de raíz	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado o medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	5	511569	5	4.44	5	4.79	5	1.16
Línea	34	837848	34	2.46	34	15.14	34	0.89
Error	170	91151	170	0.66	170	1.44	170	0.70

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 28. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de líneas F₄ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en febrero de 2010.

Línea	No. 0951	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Lectura promedio de nodulación en la Subestación de Isabela de la EEA ¹	Lectura promedio de vigor en la Subestación de Isabela de la EEA ²	Lectura promedio de pudrición de raíz en la Subestación de Isabela de la EEA ³
PR1038-26	98	1428	7.7	1.0	4.2
PR1038-2	4	1399	8.5	1.3	4.0
PR1038-1	2	1236	8.0	1.0	4.2
PR1038-25	89	1214	8.5	1.3	3.8
PR1038-22	84	1150	8.7	1.7	3.3
PR1038-20	82	1131	8.7	1.0	3.8
PR1038-13	45	1108	7.5	1.7	4.3
PR1038-19	81	1085	7.5	1.3	4.5
PR1038-5	11	1077	8.3	2.0	4.8
PR1038-14	70	1057	8.8	2.0	4.3
PR1038-21	83	1041	8.2	1.7	3.8
PR1038-16	73	879	8.5	2.0	3.8
PR1038-17	74	876	8.0	2.0	3.7
PR1038-18	77	866	8.0	1.0	4.3
PR1038-10	33	852	8.0	3.0	4.3
PR1038-6	12	826	8.7	3.0	4.7
PR1038-3	8	813	7.5	2.7	4.3
PR1038-4	10	803	6.8	1.7	4.7
PR1038-12	38	766	7.2	3.0	4.5
PR1038-27	152	689	7.3	2.7	4.7
PR1038-23	86	671	7.8	3.7	4.2
PR1038-15	71	666	7.8	2.7	4.5
PR1038-7	14	599	8.5	3.7	4.3
PR1038-11	34	590	7.8	3.7	4.5
PR1038-8	17	532	7.3	4.0	4.3
PR1038-9	26	453	8.2	4.3	4.0
PR1038-24	87	367	7.8	5.3	4.5
PR0518-10		1972	8.7	1.0	4.5
PR0443-151		1275	8.8	1.0	4.2
MDSX14797-6-1		979	8.0	2.3	4.8
SX14825-7-1		567	7.7	2.0	5

IBC302-29		500	7.2	5.0	4.8
PR0401-257		356	8.0	5.3	4.5
IBC 301-204		273	5.8	7.0	3.7
Verano		176	7.3	6.0	4.7
Media		865	7.9	2.7	4.3
DMS(0.05)		689	1.9	2.7	NS
CV(%)		34.9	10.2	44.7	19.4

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

² Evaluación de vigor usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Excelente, 3 =Bueno, 5 =Intermedio, 7 =Pobre y 9 =Muy pobre

³ Evaluación de pudrición de raíz usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Sin síntomas, 3 =Decoloración ligera, 5 =25% tejido con lesiones, 7 =50% tejido con lesiones y 9 =75% tejido con lesiones.

Cuadro 29. Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en febrero de 2010.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla Subestación Isabela		Lectura de nodulación		Lectura de vigor		Lectura de pudrición de raíz TARS	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	5	542947	5	1.82	5	22.35	5	0.48
Línea	38	759381	38	1.68	38	6.03	38	0.49
Error	190	113224	190	0.85	190	4.89	190	0.36

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 30. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de líneas F₄ de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en febrero de 2010.

Línea	No. 0956	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Lectura promedio de nodulación en la Subestación de Isabela de la EEA ¹	Lectura promedio de vigor en la Subestación de Isabela de la EEA ²	Lectura promedio de pudrición de raíz en la Subestación de Isabela de la EEA ³
PR1039-24	178-N	1571	8.5	4.3	4.3
PR1039-22	126	1305	8.5	1.3	4.7
PR1039-13	68	1165	8.7	3.0	4.2

PR1039-27	199-N	1125	8.5	3.3	4.5
PR1039-25	181-N	1103	8.0	4.7	4.2
PR1039-20	90-N	1036	8.8	3.3	4.7
PR1039-23	160	1023	8.8	2.0	4.2
PR1039-8	47	979	8.7	4.0	4.5
PR1039-28	282	965	8.2	2.3	4.5
PR1039-19	87-N	909	8.5	3.3	4.7
PR1039-12	62	868	8.5	4.7	4.5
PR1039-17	85	863	9.0	3.0	4.0
PR1039-11	61-N	853	8.8	5.7	4.5
PR1039-2	9	807	8.2	3.7	4.2
PR1039-21	95	803	9.0	4.3	4.7
PR1039-16	84	797	9.0	3.3	4.2
PR1039-30	308-N	789	8.7	3.3	4.5
PR1039-7	46	781	8.5	4.0	4.3
PR1039-4	27	764	8.7	4.0	4.2
PR1039-29	308-B	764	8.7	2.7	4.5
PR1039-10	50	721	9.0	3.3	4.5
PR1039-5	34	699	8.5	3.7	4.5
PR1039-14	69	660	7.0	3.7	3.3
PR1039-26	199-B	631	8.5	3.0	4.3
PR1039-18	86	477	8.2	3.0	4.7
PR1039-3	18	461	6.8	6.7	4.3
PR1039-15	82	377	8.8	3.3	4.2
PR1039-9	89	355	8.7	4.3	4.5
PR1039-1	6	345	7.3	4.3	4.5
PR1039-6	37	246	8.3	3.7	4.2
PR0443-151		1599	8.7	3.7	4.5
PR0518-10		1586	8.7	3.7	4.5
MDSX14797-6-1		970	7.8	3.7	4.3
SX14825-7-1		561	7.7	3.3	4.8
IBC302-29		559	7.8	5.0	5.0
PR0401-257		455	8.0	3.3	4.5
Verano		360	7.8	2.3	4.7
Amadeus 77		334	8.3	2.7	4.8
IBC301-204		220	7.8	5.3	4.7
Media		792	8.4	3.7	4.4

DMS(0.05)		771	2.1	5.1	1.4
CV(%)		42.29	11.0	60.6	13.5

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

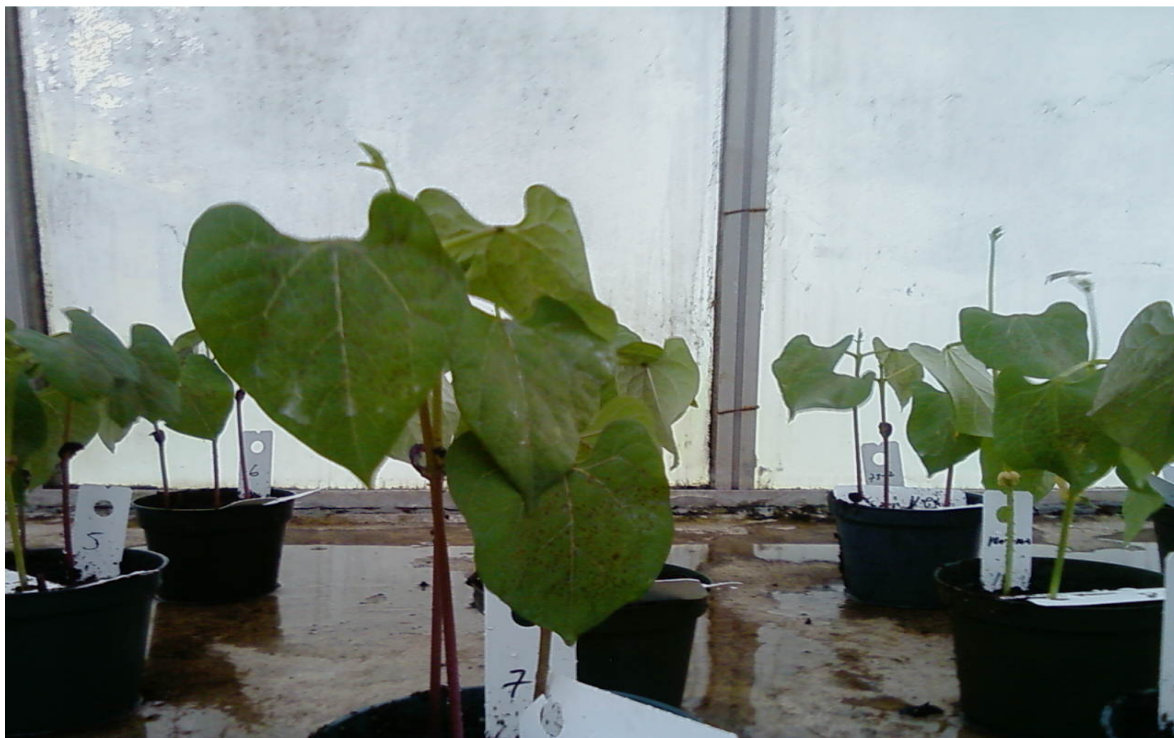
² Evaluación de vigor usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Excelente, 3 =Bueno, 5 =Intermedio, 7 =Pobre y 9 =Muy pobre

³ Evaluación de pudrición de raíz usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Sin síntomas, 3 =Decoloración ligera, 5 =25% tejido con lesiones, 7 =50% tejido con lesiones y 9 =75% tejido con lesiones.

Se encontró correlaciones fenotípicas significativas entre rendimiento y las lecturas de vigor ($r = -0.68$), nodulación ($r = -0.18$) y pudrición de raíz ($r = 0.32$) para la población PR0518-10 / PR0401-257. Se encontró para la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven unas correlaciones fenotípicas significativas entre el rendimiento de las líneas y las lecturas de nodulación ($r = 0.23$) y vigor ($r = -0.19$).

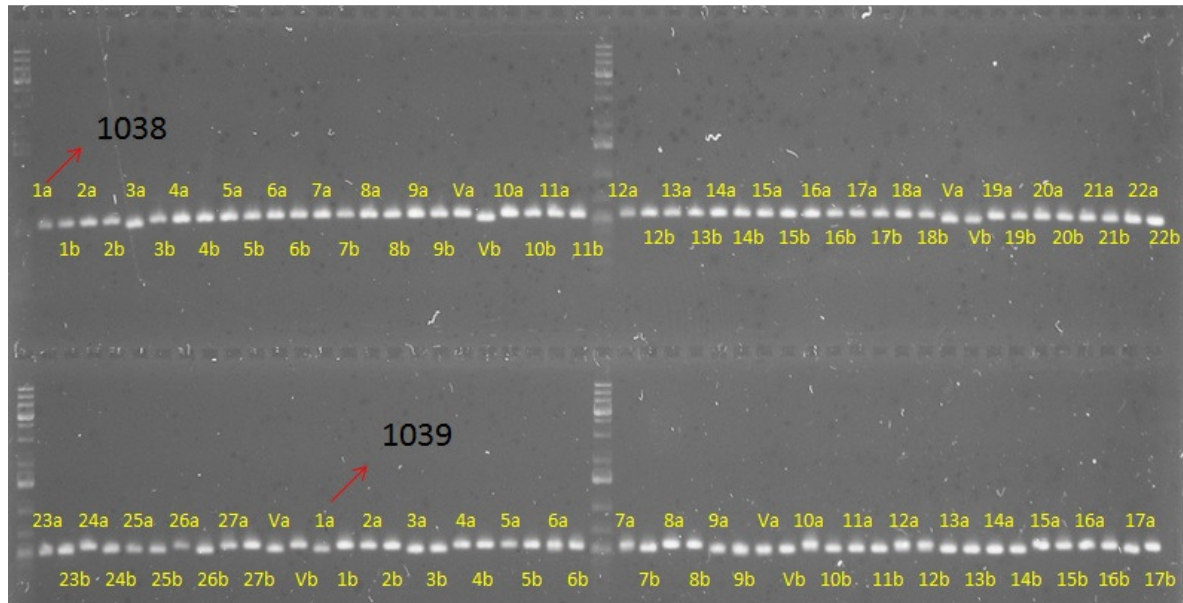
Las líneas de de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven con los mejores rendimientos fueron evaluadas para resistencia a BCMV y/o BCMNV y BGYMV. Varias plantas de líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven evaluadas en el invernadero tuvieron una reacción hipersensitiva a la inoculación con NL3 por lo que estas líneas poseen el gen *I* (Cuadro 35-36). Figura (1) muestra la reacción hipersensitiva de las líneas que indica la presencia del gen *I*.

Figura 1. Reacción hipersensitiva de algunas de las líneas a la inoculación con NL3.



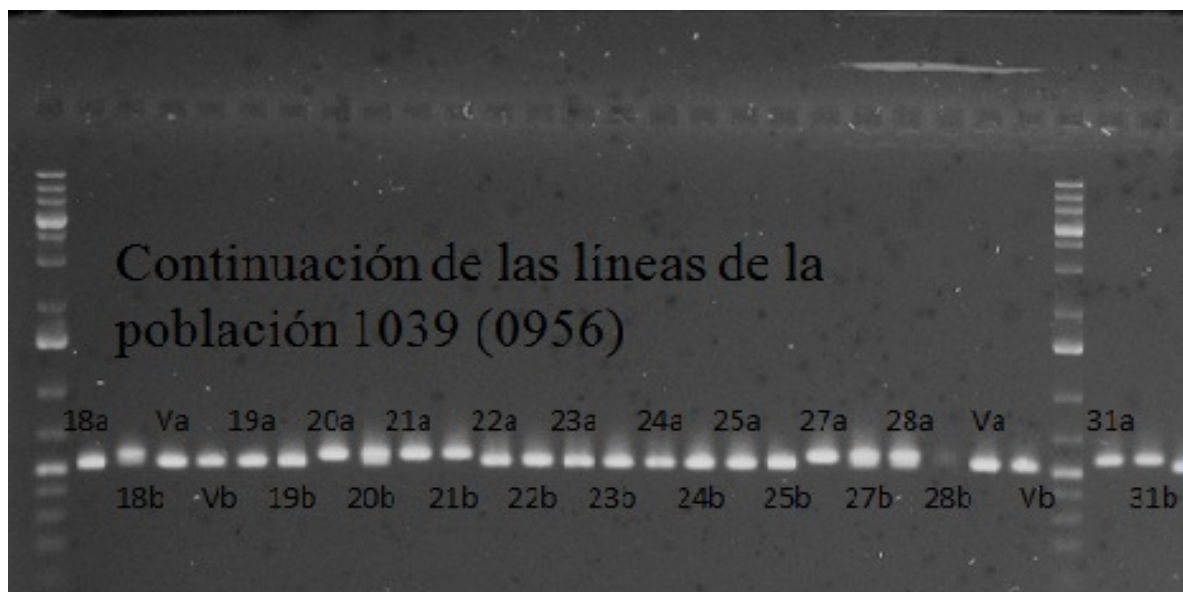
Evaluaciones de las líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven más prometedoras con el marcador SR-2 para resistencia al BGYMV identificó solo una línea de la población PR0518-10 / PR0401-257, PR1038-25, posee el gen de resistencia *bgm-1* al BGYMV. Se encontraron seis líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven con el gen de resistencia al BGYMV (Cuadro 35-36). Las figuras (2-3) muestran la localización de las bandas en el gel de las líneas resistentes y susceptibles. Se utilizó a la variedad ‘Verano’ como testigo positivo de la presencia del gen *bgm-1* para la selección de las líneas.

Figura 2. Evaluación de las líneas de habichuela de la población 1038(0951) y 1039(0956) en gel para el marcador SR-2¹.



¹ El tamaño de las bandas de la escalera cerca de las bandas de SR2 es 500. Las bandas del SCAR para bgm-1 se encuentran a 530 pares de bases (pb) y expresa resistencia, mientras que para Bgm-1 se encuentran a 570 pares de bases (pb) y expresa susceptibilidad.

Figura 3. Continuación de las líneas de habichuela de la población 1039(0956) para evaluación en el gel del marcador SR-2.



Las evaluaciones en el invernadero y con los marcadores moleculares identificaron cuatro líneas que combinan el gen *I* de resistencia a BCMV y gen *bgm-1* de resistencia a BGYMV (Cuadros 35-36). Las líneas PR1038-25, PR1039-87, PR1039-126 y PR1039-181 combinan buenos rendimientos, tolerancia a baja fertilidad y resistencia a estas dos enfermedades. Selección con el marcador SR-2 fue efectiva para el seleccionar líneas con el gen *bgm-1*.

Once líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257, y diez líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven fueron sembradas en ensayos de campo en junio de 2010 (Cuadros 8-11). Se escogieron de la población PR0518-10 / PR0401-257 líneas que tuvieron rendimientos mayores a 1,000 kg ha⁻¹ en los ensayos sembrados en febrero de 2010. Se sembró tres líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven con rendimientos menores a los 1,000 kg ha⁻¹ para no ejercer tanta presión de selección en esta población (Cuadro 11).

Las condiciones climáticas durante el verano de 2010 no fueron favorables para el desarrollo del cultivo. Durante los meses de junio, julio y agosto de 2010 hubo un total de 57 cm de precipitación. No se encontraron diferencias significativas entre las lecturas de nodulación de las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257, pero hubo diferencias en nodulación entre las líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven. Solo el testigo ‘Amadeus 77’ tuvo un valor de nodulación intermedio (6.5). No hubo diferencias significativas entre las líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven para las lecturas de pudrición de raíz (Cuadros 31-34). La mayoría de las líneas tuvieron lecturas ≥ 4 . Todas las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257

tuvieron lecturas de vigor ≤ 3.8 (Cuadro 32). Las líneas con las peores lecturas de vigor fueron los testigos Amadeus 77 e IBC 301-204. No hubo correlaciones fenotípicas significativas entre las variables nodulación, pudrición de raíz y vigor para las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257, pero sí se encontró una correlación fenotípica significativa y positiva (0.36) entre las lecturas de nodulación y de pudrición de raíz de las líneas de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven.

Tres líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257 tuvieron rendimientos $> 700 \text{ kg ha}^{-1}$ (Cuadro 32). Solo una línea de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven tuvo un rendimiento $> 700 \text{ kg ha}^{-1}$. (Cuadro 34).

Se encontraron correlaciones fenotípicas significativas y negativas entre el rendimiento de las líneas de la población PR0518-10 / PR0401-257 y las lecturas de vigor ($r = -0.71$) y pudrición de raíz ($r = -0.26$). También se encontró una correlación fenotípica significativa y negativa ($r = -0.57$) entre el rendimiento y el vigor de las líneas de la población PR0518-10//Verano//PR0003-124/Raven.

Cuadro 31 Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2009.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla		Lectura de nodulación		Lectura de vigor		Lectura de pudrición de raíz	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	5	161996	5	0.18	5	1.85	5	2.08
Línea	18	389697	18	0.31	18	3.94	18	0.48
Error	90	61117	90	0.39	90	0.34	90	0.74

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 32. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de raíz de líneas F₄ de la población PR0518-10 / PR0401-257 sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2010.

Líneas	No. 0951	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Lectura promedio de nodulación en la Subestación de Isabela de la EEA ¹	Lectura promedio de vigor en la Subestación de Isabela de la EEA ²	Lectura promedio de pudrición de raíz en la Subestación de Isabela de la EEA ³
PR1044-3	11	888	8.8	3.0	4.3
PR1044-2	4	733	8.7	3.3	4.5
PR1044-1	2	705	8.5	3.2	4.2
PR1044-11	98	697	8.8	3.3	4.7
PR1044-7	82	653	8.8	3.2	4.5
PR1044-10	89	596	8.7	3.3	4.3
PR1044-5	70	588	8.2	3.2	4.3
PR1044-6	81	538	8.7	3.7	3.7
PR1044-9	84	492	8.3	3.3	4.0
PR1044-8	83	448	8.7	3.5	4.7
PR1044-4	45	435	8.7	3.8	4.5
PR0518-10		588	8.5	3.0	4.2
PR0443-151		481	8.5	3.3	4.5
MDSX-14797-6-1		388	9.0	3.8	4.2
SX-14825-7-1		175	8.8	4.5	4.8
IBC-302-29		164	8.8	4.8	4.3
PR0401-257		142	9.0	4.7	4.0
IBC-301-204		0	8.3	5.7	4.7
VERANO		0	8.7	5.3	4.3
Media		458	8.7	3.8	4.4
DMS(0.05)		519	NS	1.2	NS
CV(%)		53.9	7.2	15.4	19.8

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

² Evaluación de vigor usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Excelente, 3 =Bueno, 5 =Intermedio, 7 =Pobre y 9 =Muy pobre

³ Evaluación de pudrición de raíz usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Sin síntomas, 3 =Decoloración ligera, 5 =25% tejido con lesiones, 7 =50% tejido con lesiones y 9 =75% tejido con lesiones.

Cuadro 33 Tabla de análisis de varianza de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2010.

Fuente de variación	Rendimiento de semilla		Lectura de nodulación		Lectura de vigor		Lectura de pudrición de raíz	
	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado medio	g.l.	Cuadrado o medio	g.l.	Cuadrado medio
Bloque	5	271335	5	1.03	5	2.04	5	1.57
Línea	18	315536	18	1.86	18	4.08	18	1.04
Error	90	46947	90	1.16	90	0.51	90	0.83

Significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

Cuadro 34. Rendimientos, lecturas de nodulación, vigor y pudrición de raíz de líneas F₄ de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven sembrada en Isabela, Puerto Rico en junio de 2010.

Líneas	No. 0956	Rendimiento de semilla (kg/ha) en Subestación de Isabela de la EEA	Lectura promedio de nodulación en la Subestación de Isabela de la EEA ¹	Lectura promedio de vigor en la Subestación de Isabela de la EEA ²	Lectura promedio de pudrición de raíz en la Subestación de Isabela de la EEA ³
PR1045-9	199N	626	8.7	3.5	4.7
PR1045-3	87N	615	8.2	3.0	4.5
PR1045-4	90N	569	8.7	2.7	4.5
PR1045-8	181N	569	8.2	3.5	4.3
PR1045-7	178N	544	7.8	3.2	4.0
PR1045-2	68	533	8.5	3.3	4.2
PR1045-6	160	476	8.5	3.2	4.0
PR1045-5	126	467	8.3	3.2	4.2
PR1045-1	47	331	8.7	3.7	3.2
PR1045-10	282	246	8.8	2.7	3.5
PR0443-151		905	8.7	2.3	4.0
PR0518-10		683	8.8	3.8	4.5
MDSX-14797-6-1		577	8.2	3.5	4.0
PR0401-257		481	8.8	4.0	4.5

IBC-302-29		323	8.7	4.5	4.2
SX-14825-7-1		279	8.0	3.2	4.7
AMADEUS 77		101	6.5	5.5	3.7
IBC-301-204		38	8.5	4.8	4.7
VERANO		33	9.0	4.8	4.5
Media		442	8.4	3.6	4.2
DMS(0.05)		454	2.3	1.5	NS
CV(%)		49.0	12.9	19.8	21.8

¹ Escala de nodulación del CIAT 1-9 donde 1 = > 80 nódulos planta⁻¹, 3 = 41-80 nódulos planta⁻¹, 5 = 21-40 nódulos planta⁻¹, 7 = 10-20 nódulos planta⁻¹ and 9 = < 10 nódulos planta⁻¹

² Evaluación de vigor usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Excelente, 3 =Bueno, 5 =Intermedio, 7 =Pobre y 9 =Muy pobre

³ Evaluación de pudrición de raíz usando la escala del CIAT 1-9: 1 =Sin síntomas, 3 =Decoloración ligera, 5 =25% tejido con lesiones, 7 =50% tejido con lesiones y 9 =75% tejido con lesiones.

Conclusiones

La estrategia utilizada para desarrollar líneas de habichuela que combina resistencia al BCMV y BGYMV y mayor tolerancia a los suelos bajos en N fue un éxito. Iniciamos el proceso de evaluación con 12 poblaciones para tener una base genética amplia. Un total de 590 líneas F₃ fueron evaluadas en los ensayos sembradas en junio de 2009. Diez de las poblaciones no mostraron adaptación a las condiciones húmedas y cálidas del verano. Por lo tanto, nos enfocamos en la evaluación de las líneas de las dos poblaciones que tuvieron el mejor comportamiento en los ensayos sembrados en junio de 2009. Unas pocas líneas fueron identificadas que produjeron buenos rendimientos en los ensayos en campos con bajos niveles de N en el suelo. Debido a la baja heredabilidad de tolerancia al estrés abiótico nos enfocamos primero en la selección de líneas adaptado a los suelos con bajos niveles de N en el suelo. Entre las líneas que mostraron mejor adaptación a este factor edáfico, logramos identificar líneas que tienen los genes de resistencia al BCMV y BGYMV.

Línea PR1038-26 de la población PR0518-10 / PR0401-257 produjo entre los más altos rendimientos en los cuatro ensayos de campo (Cuadro 35). Sus rendimientos son comparables con el testigo PR0518-10. Esta línea tiene un grano negro que sería comercialmente aceptable en Haití y ciertos países en Centroamérica. PR1038-26 todavía esta segregando para resistencia al BCMV y BGYMV. Por lo tanto, pretendemos realizar selecciones de plantas individuales ($F_{5,6}$) dentro de la línea y confirmar la reacción de las líneas hermanas al los virus utilizando inoculaciones en el invernadero para BCMV y el marcador SCAR SR-2 para BGYMV. La semilla de las líneas con resistencia serán multiplicadas y su comportamiento será validado en ensayos replicados en Puerto Rico, Haití y Honduras.

La línea PR1038-25 de la población PR0518-10 / PR0401-257 produjo buen rendimiento en 3 de los 4 ensayos (Cuadro 36). El rendimiento de esta línea fue bajo en el ensayo sembrado en la Subestación de TARS en junio de 2009 aunque la línea no mostró síntomas de pudrición de raíz en este ensayo. Esta línea también es de grano negro y esta segregando para resistencia a los virus BCMV y BGYMV. Pretendemos utilizar la misma estrategia para purificar y validar el comportamiento de las líneas hermanas seleccionadas de PR1038-25.

Debido a su pedigrí, encontramos un mayor número de las líneas de la población PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven con resistencia al BCMV y BGYMV. Dos líneas de grano negro, PR1039-22 y PR1039-25, y una línea de grano blanco, PR1039-13, produjeron rendimientos comparables con el testigo PR0518-10 (Cuadro 36).

Pretendemos utilizar la misma estrategia para purificar y validar el comportamiento de las líneas hermanas seleccionadas de PR1039-22, PR1039-26 y PR1039-13.

Las líneas con mejor adaptación a los suelos con bajos niveles de N tienden a mostrar más vigor durante la etapa de crecimiento vegetativo. Las líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven mostraron niveles moderados de resistencia a las pudriciones de las raíces. Las lecturas promedios de pudrición de la raíz de las líneas sobresalientes en los ensayos sembradas en febrero y junio de 2010 fueron < 5. Las líneas de las poblaciones PR0518-10 / PR0401-257 y PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven mostraron más resistencia a bacteriosis común y mayor tolerancia al calor que las otras 10 poblaciones. Los pedigríes de las dos poblaciones tienen los progenitores PR0401-257 y Verano que poseen altos niveles de resistencia a bacteriosis común y tolerancia al calor.

Las evaluaciones con el marcador SCAR SR-2 para *bgm-I* fueron sencillas, éste marcador es bastante específico por lo que es una buena herramienta para seleccionar indirectamente líneas que pudieran tener resistencia a BGYMV. Para selección de resistencia a BCMV las evaluaciones que mejor resultado mostraron fueron las inoculaciones mecánicas con NL3 del BCMNV ya que evaluaciones que se realizaron con el marcador SW-13 para gen *I* no fueron efectivas. Este es un marcador muy sensible por lo que su manejo puede ser complicado.

No encontramos líneas con buena nodulación aunque las líneas sobresalientes produjeron rendimientos > 1,000 kg/ha en campos que no recibieron aplicaciones de fertilización nitrogenada ni inoculación de *Rhizobium*. La aplicación del fungicida

Captan pudo tener un efecto en las poblaciones de *Rhizobium* en el suelo y por consecuente afectar la nodulación de las plantas con el *rhizobium* del suelo ya que según informado por Acuña y Ramírez, 1986 estudios realizados demostraron que la aplicación de este plaguicida a la semilla de leguminosas puede reducir las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo. A pesar de falta de una buena nodulación de las plantas estas pudieron producir rendimientos aceptables. Un rendimiento de 1,000 kg/ha sería una mejora para muchos productores de frijol en Haití y América Central.

Cuadro 35. Resumen del comportamiento de las líneas seleccionadas de la población derivada del cruzamiento PR0518-10 / PR0401-257.

Línea	Tipo de semilla	Rendimiento de semilla (kg/ha)				Reacción al NL3	Evaluación con SR-2
		F ₃ UPR Junio 2009	F ₃ TARS junio 2009	F ₄ febrero 2010	F ₅ junio 2010		
PR1038-22	Negro	2645	700 (46)	1150 (5)	492 (9)	Susceptible	Susceptible
PR1038-13	Negro	2456	750 (40)	1108 (7)	435 (11)	4/4 TN	Susceptible
PR1038-14	Negro	2217	1167 (22)	1057 (10)	588 (7)	1/3 TN	Susceptible
PR1038-19	Negro	2195	1350 (13)	1085 (8)	538 (8)	3/5 TN	Susceptible
PR1038-25	Negro	2150	742 (42)	1214 (4)	596 (6)	3/6 TN	bgm
PR1038-20	negro	2117	1367 (12)	1131 (6)	653 (5)	4/4 TN	Susceptible
PR1038-2	negro	2112	67 (79)	1399 (2)	733 (2)	1/5 TN	Susceptible
PR1038-26	negro	2034	1634 (1)	1428 (1)	697 (4)	2/3 TN	Seg. bgm
PR1038-5	negro	2028	92 (78)	1077 (9)	888 (1)	Susceptible	Susceptible
PR1038-1	negro	1962	33 (82)	1236 (3)	705 (3)	Susceptible	Susceptible
PR0518-10	Negro	1900	919	1972	588		
PR0401-257	Rosada	1471	800	356	142		
Media		1703	725	792	458		
DMS (0.05)		963	1208	771	519		
CV(%)		35	41.9	42.3	53.9		

Cuadro 36. Resumen del comportamiento de las líneas seleccionadas de la población derivada del cruzamiento PR0518-10///Verano//PR0003-124/Raven.

Línea	Tipo de semilla	Rendimiento de semilla (kg/ha)				Reacción al NL3	Evaluación con SR-2
		F ₃ UPR Junio 2009	F ₃ TARS junio 2009	F ₄ febrero 2010	F ₅ junio 2010		
PR1039-8	Blanco	1528	834	979	331	Susceptible	Susceptible
PR1039-13	Blanco	2106	1092	1165	533	2/2 TN	bgm
PR1039-19	Negro	1906	617	909	615	2/5 TN 3/5 M	bgm
PR1039-20	Negro	1906	951	1036	569	5/5 TN	Susceptible
PR1039-22	Negro	1728	717	1305	467	3/3 TN	bgm
PR1039-23	Blanco	1612	842	1023	476	Susceptible	bgm
PR1039-24	Negro	1861	967	1571	544	Susceptible	bgm
PR1039-25	Negro	1739	951	1103	569	3/4 TN 1/4 M	bgm
PR1039-27	Negro	1778	867	1125	626	Susceptible	Susceptible
PR1039-28	Blanco	1723	384	965	246	No germinó	Susceptible
PR0518-10	Negro	1662	915	1586	683		
Verano	Blanca	1137	506	360	33		
Media		1254	685	792	442		
DMS (0.05)		727	NS	771	452		
CV(%)		35.4	41.9	42.3	49.0		

Recomendaciones

- Se recomienda realizar evaluaciones más exhaustivas de las líneas seleccionadas en otros ambientes y localidades para garantizar que estas poseen las características de interés.
- Evaluaciones en campos bajo poca o ninguna presión de patógenos del suelos se pueden realizar para ver el verdadero potencial de estas líneas.
- Las líneas seleccionadas pudieran tener tolerancia a altas temperaturas por lo que se podrían realizar ensayos posteriores para confirmar esta tolerancia.
- Las líneas seleccionadas mostraron tener potencial de resistencia a bacteriosis y pudrición de raíz por lo que se recomienda desarrollar un programa de selección para estas líneas y confirmar la resistencia con diferentes pruebas.
- Para evaluación de la nodulación deben implementarse diferentes escalas y evaluaciones que midan no solamente el aspecto de cantidad de nódulos sino también la calidad de la nodulación.
- Alguno fungicidas para la protección de la semilla pueden tener efectos negativos en la poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno por lo que se recomienda utilizar fungicidas que no afecten el desarrollo de estas poblaciones naturales.

Referencias

- Abawi, G.S. Root rots. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, CO. 1989. p. 105-157.
- Acuña, O. 1996. Manejo y tecnología de la fijación biológica de nitrógeno en Leguminosas de importancia agrícola. X Congreso Nacional Agronómico/ II Congreso de Suelos. p. 89-94.
- Acuña, O., Cordero, A. 1989. Efecto de las diferentes dosis de molibdeno, fosforo y Calcio sobre la nodulación y crecimiento del frijol en un ultisol de Puriscal. Agronomía Costarricense 13(2): 193-196.
- Acuña, O. Ramírez, C. 1986. Efecto de fungicidas sobre la multiplicación y Sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* en soya (*Glycine max*). Ceiba 27(1) 129-137.
- Alameda, M., Beaver, J. y Osorno, J. M. 2004. Uso de marcador molecular SR-2 para seleccionar líneas de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) para la resistencia al virus del mosaico dorado amarillo. Memorias Reunión Científica Anual SOPCA. Arroyo, PR.
- Alvarado, P.G. 2009. Optimización del protocolo para el marcador molecular SR-2 del gen bgm-1 de resistencia al virus del mosaico dorado amarillo del frijol. B.S. Tesis Zamorano, Honduras.
- Araya, M. 2003. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. Fitopatol. Bras. 28:221-228.
- Araya, R., Acosta, J.A. 2000. Adaptación del frijol a suelos de baja fertilidad bajo presión de enfermedades foliares en Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 11:31-36.
- Beaver, J. & Osorno, J.M. 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. Field Crops Research 168:145-175.
- Beaver, J. 2009. Guía práctica para la producción de habichuela.
- Beaver J., Zapata, M. Alameda, M., Porch, T., Rosas, J.C., Godoy-Lutz, G., & Prophete, E. 2006. Mejoramiento Genético del frijol en el Caribe. Cartel presentado en el II Congreso Internacional del Frijol Zacatecas. 5-9 agosto 2009. <http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/CI%20Frijol/11.PDF>

- Bliss, F.A. 1993a. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant and Soil*. 152:71-79.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Van Schoonhoven, A. and Pastro-Corrales, M.A. (compilers). Cali, Colombia. 54 p.
- Cordero-García, M. 1979. Efecto de la inoculación con *Rhizobium phaseoli* y la fertilización nitrogenada en el comportamiento de la habichuela seca, *Phaseolus vulgaris*. M.S. Thesis. Univ. of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 58p.
- Dardon, D.E. 1993. La mosca blanca en Guatemala p. 38-41. In: L. Hilje and O.Arboleda. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Departamento de Agricultura. 2010. Distribución de ingreso bruto agrícola de productos. <http://www.gobierno.pr/NR/rdonlyres/4A81AD1D-4A66-46C9-95AD6A3C56F2EF48/0/DistribucionIngresoBrutoAgricolaProductos.pdf>
- Diez-Navajas A.M., Ruiz de Galarreta J.I., Legorburu F.J. 2003. Técnicas de detección de los virus del mosaico común (BCMV) y necrótico (BCMNV) de la judía. III Seminario de judía de la Península Ibérica. Lorenzana (Lugo). Actas de la asociación española de leguminosas 2:125-130.
- Dorcinvil, R., Sotomayor, D. & Beaver J.S. 2010. Agronomic performance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines in an Oxisol. *Field Crop Research* 118:264-272.
- Drijfhout, E., M.J. Silbernagel & D.W. Burke. 1978. Differentiation of strains of bean common mosaic virus. *Neth. J. Pl. Path.* 84 (1978) 13-26
- Echemendía, A.L., Ramos, P.L., Villareal, N., Martínez, A.K., González, G. y Morales, F.J. 2010. Caracterización del virus del mosaico amarillo dorado del frijol en Cuba. *Fitosanidad* v.14 n.1 Ciudad de la Habana
- Echemendía, A.L.; Ramos, P.L.; Peral, R.; Porras, A.C. & Gonzalez, G.A. 2007- Selección de genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes al virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV) por hibridación de ácidos nucleicos. *Fitosanidad* 11(4):1-72.
- Fernández-Toledo, F.E. 1996. Evaluación de treinta genotipos de habichuela común (*Phaseolus vulgaris* L.) con tolerancia a calor para potencial de

fijación de nitrógeno. M.S. Thesis. Univ. of Puerto Rico, Mayagüez Campus, Puerto Rico. 84p.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2008. Guía de identificación y manejo integrado de las enfermedades del frijol en América Central / IICA/ Proyecto Red SICTA, COSUDE. Managua: IICA, 2008. 32 p. 24 x 9.5 cm

Kelly, J., Afanado, L., Haley, S., & Miklas, P. 1994. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento del frijol. *Agronomía Mesoamericana* 5: 1-7.

Kelly JD, Hosfield GL, Varner GV, Uebersax MA, Haley SD, Taylor J. 1994 Registration of 'Raven' black bean. *Crop Sci* 34:1406–1407.

Michigan State University. 2010. 0.1M Phosphate Buffer (PB). Lab Recipes and Protocols. Anatomy recipes.
<https://www.msu.edu/~eisthen/lab/methods/anatomy/recipes/PB.html>

Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.D., and Blair, M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147:105-131.

Miklas P.N., Lambert, S., Mink, G., Silbernagel, M. 1998. Many beans with bc-3 resistance to BCMNV are susceptible to BCMV. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 41:33-34.

Montiel- González, L.; González-Flores, F.; Sánchez-García, B. M.; Guzmán-Rivera, S.; Gámez-Vázquez, F. P.; Acosta-Gallegos, J. A.; Rodríguez-Guerra, R.; Simpson, W. J.; Cabral-Enciso, M. y Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudriciones, en cinco estados del centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23:1-10.

Morales, F. J. 2000. El mosaico dorado y otras enfermedades del fríjol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. CIAT, Cali, Colombia, 169 p.

Morales, F.J. 1994. Comparative responses of selected (*Phaseolus vulgaris*) germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. p.146-147. *In*. Bean golden mosaic 1994 Research Advances. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Morales, F.J. 1987. Bean golden mosaic virus: Germplasm evaluation methodology. CIAT Bean Program Newsletter. Vol. 9 No. 1. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

- Muller, S., Pereira, P.A., & Martin, P. 1993. Effect of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil. 152:139-143.
- Peña, Z. & Trujillo, G. 2007. Identificación de virus que se transmiten a través de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers) en áreas productoras de Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía-Luz 24:1-21.
- Polston, J.E.; Anderson, P.K. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por moscas blancas en tomate en el Hemisferio Occidental. Manejo de Plagas. Pág. 53: 24-42.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, (PNUMA), 2003. GEO America Latina y el Caribe: Perspectivas del medio ambiente 2003. PNUMA Oficina Regional para America Latina y el Caribe, México, D.F., México. 281 pp. ISBN: 9280722956, 9789280722956.
- Qiagen. 2006. DNeasy Plant Handbook. DNeasy Plant 96 Plant Kit Protocol. Julio 2006, 54 pp.
- Rahman, M.A.; Hoque, A.K.M.S., Rahman, M.N., Talukdar, M.B. & Islam, M.S. 2007. Effect of nitrogen and phosphorus on the growth and yield french bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). J. Soil. Nature. 1(2): 30-34
- Rosas, JC; Gallardo, O; Jiménez, J. 2003. Mejoramiento del Frijol Común Mediante Enfoques Participativos en Honduras. Agronomía Mesoamericana 14(1): 1-9
- Sánchez, B.M., González, F., Pons, J.L., Acosta, J.A., Cabral, M., Fraire, S. Simpson, J. y Rodríguez, R. Fusarium Lateritium: Nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. Agricultura Técnica en México. Vol. 32 Num. 3. 2006 p. 251-257.
- Singh, S.P. Terán, H., Muñoz, C.G., Osorno, J.M., Takegami, J.C., Thung, M.D.T. 2003. Low soil fertility tolerance in landraces and improved common bean genotypes. Crop Sci. 43:110–119.
- Singh, S. P., Gepts, P., and Debouck, D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot. 45: 379- 196.
- Sotomayor, D. 2010. Niveles críticos de nutrientes en el suelo. Notas de clase del Curso de fertilidad de suelos. Univ. de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez. 1p.

- Sundstrom, F., Morse, R., Neal, J. 1982. Nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. grown minesoil as affected by soil compactation and plant analysis. 13(3): 231-242.
- Trinidad, A., Aguilar, D. 1999. Fertilización foliar un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos. Terra volumen 17, número 3.
- Urrea, C.A., P.N., Miklas, Beaver, J.S. & Riley, R.H. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 12:1035–1039.
- Urquiaga, S., Jantalia, C.P., Luzio, W., Alves, B. J. R, Boddey, R. M. 2005. El horizonte del suelo. Revista de la Ciencia y el Suelo Nutrición Vegetal. 5(2):46-60
- Vargas, A.G. 2008. Selección de genotipos de frijol común tolerantes a bajo contenido de Nitrógeno en el suelo. B.S. Tesis. Zamorano, Honduras.
- Velez, J., M.J. Bassett, J.S. Beaver and A. Molina. 1998. Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123:628–631.
- Vencatasamy, D., Peerally, M. 1981. Effects of certain environmental factor son nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Revue Agricole et Sciere de I Ile Maurice 60(2): 61-70.
- Voysest O., 2000. Mejoramiento genético del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L). Legado de variedades de América Latina 1930 - 1999. CIAT. Cali. Colombia. 195 p.
- Yoshii, K., Galvez, G. E., y Lyon, H.1979. Evaluación de germoplasma de (*Phaseolus vulgaris* L.) por tolerancia al mosaico dorado del frijol. XXV Reunión Anual de PCCMCA, Tegucigalpa, Honduras. L 25: 1- 8.

Apéndice

Apéndice 1. Efecto que causa la pudrición de raíz en raíces de habichuela.



Apéndice 2. Nodulación de algunas de las mejores líneas¹ de habichuela



¹ Línea IBC 301-204 con un valor de nodulación de 6 bajo la escala del CIAT, 1987.

Apéndice 3. Raíz de líneas de habichuela sin presencia de nódulos.

