Estudio de la reacción al *Virus del Mosaico Necrótico Común del Frijol* (BCNMV) y la habilidad de fijación biológica del nitrógeno (FBN) en frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) e introgresión de la FBN al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

por

Ana Gabriela Vargas Palacios

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
2016

Aprobada por:

Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
Timothy Porch, Ph. D. Co-Presidente, Comité Graduado	Fecha
James Beaver, Ph. D. Co-Presidente, Comité Graduado	Fecha
Elvin Román Paoli, Ph. D. Director del Departamento	Fecha
Aixa Rivera, M. Sc. Representante de Estudios Graduados	Fecha

ABSTRACT

The tepary bean is a crop that has great potential for expansion in hot and dry regions of Latin America, the Caribbean and Africa, regions that are most vulnerable to the effects of climate change. The tepary bean also has the potential to improve the heat and drought tolerance of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A tepary diversity panel (TDP) of 315 tepary accessions from CIAT, USDA and USDA-ARS-TARS and 2 interspecific populations (INB and SK), derived from a Mesoamerican and Andean respectively, common bean recurrent parents, were evaluated for their ability to nodulate with *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. Strains were evaluated from collections from USDA, CIAT and Zamorano, and from cultures isolated from 3 locations in Puerto Rico. Experiments were conducted under greenhouse conditions, with seed planted in benches filled with sand for the assessment of biological nitrogen fixation. A Randomized Complete Block Design was used with a total of 3 blocks and 4 plants per block in each experiment. Results were analyzed by ANOVA and means were compared using the LSD ($P \leq 0.05$) test. Tepary accessions G40142 and G40161 were superior in their ability to nodulate when inoculated with strain USDA 3254. Interspecific lines with transgressive segregation, according to the established nodulation parameters evaluated, were found. Interspecific lines INB 817 and A-5-6 had superior nodulation values. Phylogenetic analyzes were conducted based on *nod*C, *atp*D and *rec*A genes, using the Neighbour-Joining method. Additional evaluations were conducted by inoculating the tepary diversity panel with the NL3 strain of *bean common mosaic necrosis vi*rus (BCMNV) and visually scoring the symptoms. An ELISA test was also used to detect the virus in inoculated plants. The BCMNV screening was conducted under greenhouse conditions during the warm season when high temperatures are prevalent. Tepary bean genotypes G40085, G40099, G40171, and G40178 showed no symptoms in response to inoculation with the strain BCMNV NL3 D, indicating their resistance to the strain evaluated.

RESUMEN

El frijol tépari es un cultivo de importancia por su potencial expansión en regiones de climas cálidos y secos de América Latina, El Caribe y África que son vulnerables a los efectos del cambio climático. El frijol tépari también tiene el potencial de mejorar la tolerancia al calor y la sequía en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a través de cruces interespecíficos. Un panel de diversidad (TDP) de este cultivo de 315 accesiones provenientes de CIAT, USDA y el programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS y dos poblaciones interespecíficas (INB y SK) con padres recurrentes de frijol común andino y mesoamericano respectivamente, fueron evaluados por su habilidad de nodulación en simbiosis con cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* provenientes de las colecciones de USDA, CIAT, Zamorano y aislados correspondientes a 3 localidades en Puerto Rico. Experimentos fueron conducidos en condiciones de invernadero, utilizando bancos con arena para las evaluaciones de la fijación biológica del nitrógeno, utilizando un diseño de bloques completamente randomizados, con totales de 3 bloques y 4 plantas por bloque en cada experimento. Los datos fueron analizados con un ANOVA y la prueba de la DMS. Los genotipos de tépari G40142 y G40161 fueron superiores por su habilidad de nodulación cuando fueron inoculados con la cepa USDA 3254. Las líneas interespecíficas INB 817 y A-5-6 fueron superiores a sus padres por los parámetros de nodulación evaluados. Análisis filogenéticos fueron conducidos basados en los genes *nod*C, *rec*A y *atp*D. Evaluaciones con inoculaciones de la cepa del *Virus de Mosaico Necrótico Común del Frijol* (BCMNV) NL 3 D también fueron conducidas con el panel de diversidad, para evaluar la respuesta fenotípica de tépari a esta cepa, complementado con pruebas de ELISA para detectar la presencia del virus. Los genotipos fueron evaluados para reacción al NL 3 D bajo condiciones de invernadero durante la época con temperaturas más elevadas del año. Los genotipos de tépari G40085, G40079, G40171, G40178 no mostraron síntomas como respuesta a la inoculación con la cepa NL 3 D de BCMNV, mostrando resistencia a la cepa evaluada.

AGRADECIMIENTOS

Durante mis estudios de maestría, ha sido determinante tener la oportunidad de compartir con personas que han aportado a mi vida en lo profesional pero también en lo personal, y gracias a las cuales esta experiencia ha sido sumamente enriquecedora.

Sea oportuno el agradecimiento al proyecto *Legume Innovation Lab* - USAID por el financiamiento de mis estudios.

A mis profesores asesores: Dr. James Beaver, Dr. Timothy Porch, Dra. Consuelo Estévez de Jensen. Me siento sumamente privilegiada de haber sido su estudiante y poder formarme con ustedes. Gracias por depositar en mí su confianza y por su inmensurable ayuda, en lo profesional y lo personal. Gracias por cada oportunidad, cada consejo, cada momento de guía.

A la Dra. Linda Beaver, por todas sus enseñanzas, orientación y confianza.

Al Dr. John Hart, por sus múltiples ideas y consejos e invaluable colaboración en mis proyectos.

Al Dr. Feiko Ferwerda por su presta ayuda.

Al equipo de frijol: Abraham Montes, Abiezer González, Stephanie Cosme y Yulia Truchkina, por su oportuna y grata colaboración en la realización de cada una de las etapas.

Al Dr. Ricardo Goenaga, por su valiosa colaboración durante mi estadía en TARS.

Al personal de USDA-ARS-TARS, por todo su apoyo mediante las facilidades y cálida acogida.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por ser siempre un consejero y brindarme su apoyo.

A mis compañeros y amigos estudiantes de fitomejoramiento, porque de cada uno aprendí y sé que vamos a encontrarnos en el resto del camino.

A mi familia, por enseñarme el amor por la tierra y cultivar en mi la pasión por la agricultura, de forma muy especial a mi mamá Ivis (†) y mis tíos Ernesto y María, por jugar roles tan claves en mi vida. A mi mamá, por darme amor incondicional y educación, creer en mí y ser siempre mi gran amiga.

A los pequeños agricultores de mi región, porque su diaria labor representa el legado de nuestras generaciones.

LISTA DE CONTENIDO

ABSTRACT…… ii

RESUMEN……... iii

AGRADECIMIENTOS…… iv

LISTA DE CONTENIDO…… v

LISTA DE TABLAS…… vi

LISTA DE FIGURAS…… vii

LISTA DE APÉNDICES……..…… viii

I-INTRODUCCIÓN…… 1

II-OBJETIVOS…… 4

III-REVISIÓN DE LITERATURA…… 5
III.1-Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)…….
III.2-Aspectos Moleculares de la FBN……..…….
III.3-FBN en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)……
III.4-Frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* A.Gray)……..
III.5-FBN en frijol tépari……
III.6-Nodulación en híbridos interespecíficos……
III.7-Aspectos de la generación de híbridos interespecíficos…….
III.8-*Virus del Mosaico Común del Frijol* (BCMV) en frijol tépari y aspectos generales de la resistencia en frijol común……..

IV-MATERIALES Y MÉTODOS……... **17**
IV.1-Selección de cepas de *Bradyrhizobium*……..
IV.2-Selección de genotipos de frijol tépari……...
IV.3-Evaluación de poblaciones interespecíficas por su nodulación con cepas de *Bradyrhizobium*……
IV.4-Evaluación de aislados de Puerto Rico en frijol tépari……..
IV.5-Evaluación de líneas superiores de frijol tépari e interespecíficas en condiciones de campo…….
IV.6-Secuenciación de genes *nod*C, *atp*D, *rec*A de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*……
IV.7-Desarrollo de población interespecífica para la introgresión de la Fijación Biológica de Nitrógeno en frijol común…….
IV.8-Resistencia a BCMV y BCMNV en frijol tépari……...

V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN…… **39**
V.1-Selección de cepas de *Bradyrhizobium*……...
V.2-Selección de genotipos de frijol tépari……

V.3-Evaluación de poblaciones interespecíficas por su nodulación con cepas de *Bradyrhizobium*……
V.4-Evaluación de aislados de Puerto Rico en frijol tépari……
V.5-Evaluación de líneas superiores de frijol tépari e interespecíficas en condiciones de campo……..
V.6-Secuenciación de genes *nod*C, *atp*D, *rec*A de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*……
V.7-Desarrollo de población interespecífica para la introgresión de la Fijación Biológica de Nitrógeno en frijol común…….
V.8-Resistencia a BCMV y BCMNV en frijol tépari…….

VI-REFERENCIAS……...…….. 86

VII-APÉNDICES…….. 94

LISTA DE TABLAS

Tablas		Páginas
Tabla 1.	Características de los genotipos inoculados con diferentes cepas de *Bradyrhizobium*. Mayagüez, Puerto Rico, 2014.	18
Tabla 2.	Tabla 2. Genotipos de la colección de CIAT, peso de 100 semillas (g), país de origen y región, evaluados para identificar genotipos superiores, por sus valores de nodulación inoculados con las cepas USDA 110 + USDA 3254 de *Bradyrhizobium* en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.	20
Tabla 3.	Genotipos cultivados del panel de diversidad de tépari (TDP), país y región, evaluados para identificar genotipos superiores por sus características de nodulación con la cepa USDA 3254 en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.	24
Tabla 4.	Género, especie, y fuente de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* utilizadas en los experimentos en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.	33
Tabla 5.	Iniciadores y programas de PCR utilizados en la secuenciación de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.	34
Tabla 6.	Número de nódulos y peso fresco de nódulos de 20 genotipos de tépari evaluados en la selección de cepas de *Bradyrhizobium* y peso de 100 semillas (g) en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.	41
Tabla 7.	Número de nódulos y peso (g) de líneas de tépari de la colección de CIAT y del programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS inoculadas las cepas USDA 110 + USDA 3254 de Bra*dyrhizobium* evaluado 21 días después de la inoculación en Mayagüez, Puerto Rico. 2014.	42
Tabla 8.	Número de nódulos, peso fresco y peso promedio de un nódulo (mg) de líneas cultivadas del panel de diversidad de tépari (TDP) inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 3254 evaluado 21 días después de la inoculación en Mayagüez, Puerto Rico. 2014.	48
Tabla 9.	Número de nódulos y peso (mg) de líneas híbridas interespecíficas INB inoculadas con las cepas USDA 110 + USDA 3254 de *Bradyrhizobium* evaluadas 21 días después de la inoculación en Mayagüez, Puerto Rico. 2014.	54

Tabla 10. Número de nódulos y peso (g) de híbridos interespecíficos de la U. de Saskatchewan (SK) inoculados con las cepas USDA 110 y USDA 3254 de *Bradyrhizobium* evaluados 21 días después de la inoculación en Mayagüez, Puerto Rico. 2014. 58

Tabla 11. Número de nódulos, peso de nódulos (mg), diámetro de nódulos (mg) y distancia del primer nódulo, de rizobios aislados en Puerto Rico estudiados con 10 genotipos de frijol tépari en Mayagüez, Puerto Rico, 2014. 61

Tabla 12. Valor agronómico, ubicación, color y número de nódulos de líneas interespecíficas INB y SK, y líneas de tépari inoculadas con la cepa USDA 3254. Sub-estación Experimental Agrícola en Isabela, Puerto Rico. 2014. 63

Tabla 13 Genotipo, estado biológico, lugar de recolección, respuesta fenotípica a la cepa de *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) NL 3 D en las hojas primaria y trifoliada, y resultados de la prueba ELISA en genotipos del panel de diversidad de tépari (TDP) y líneas de mejoramiento del programa de USDA-ARS-TARS en Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015. 72

Tabla 14. Genotipo, estado biológico, lugar de recolección, respuesta fenotípica a la cepa de *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) NL 3 D en las hojas primaria y trifoliada, y resultados de la prueba ELISA en 9 genotipos del panel de diversidad de tépari en Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015. 81

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
Figura 1.	Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *nod*C de 807 pb.	65
Figura 2.	Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *rec*A de 500 pb.	67
Figure 3.	Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *atp*D de 500 pb.	68
Figura 4.	Rescate *in vitro* de embriones de híbridos interespecíficos. 4.1= vainas con embriones sin crecimiento, 4.2= vainas *in vitro* 12 días después de transferencia, 4.3= semillas germinadas a los 8 días a partir de vainas transferidas, 4.4= vainas con embriones con crecimiento limitado, 4.5 semillas germinadas a partir de embriones transferidos directamente al medio, 4.6= aclimatación de plantas en maceteros con medio estéril.	69
Figura 5.	Desarrollo de híbrido interespecífico. 5.1= transferencia de embrión a medio de crecimiento estéril, crecimiento del híbrido F1 con sus respectivos parentales (izquierda *P. vulgaris*, centro= híbrido interespecífico, derecha= *P. acutifolius*), 5.3= 6 semillas producidas producto de la retrocruza con polen de frijol tépari.	70
Figura 6.	Tipo de crecimiento de plantas retrocruzadas hacia parental tépari. 6.1= hojas primarias correspondientes a la morfología de tépari, 6.2= hojas primarias correspondientes a la morfología de frijol común, 6.3= plantas con crecimiento anormal.	71
Figura 7.	Tipo de crecimiento de vainas y semillas interespecíficas retrocruzadas hacia el parental tépari. 7.1= semillas redondas color negro brillante y vainas con 6-7 semillas, 7.2= semillas color negro opaco y negro brillante, redondas y planas con desarrollo limitado, 7.3= semillas color negro opaco y rojo con desarrollo no deseado.	71
Figura 8.	Reacción fenotípica de genotipos de cultivados y silvestres de tépari, a la inoculación con la cepa NL 3 D de BCMNV. 8.a.1 y 8.b.1= necrosis en hojas primarias, 8.a.2 y 8.b.2= no síntomas en hojas primarias, 8.a.3 y 8.b.3= mosaico, 8.a.4= enrollamiento de hoja, 8.a.5	85

y 8.b.5= lesiones necróticas en hojas trifoliadas, 8.a.6 y 8.b.6= no síntomas en hojas trifoliadas.

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices		Páginas
Apéndice 1.	Características morfológicas de aislados de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* cultivados en medios YMA, YMA+CR, YMA+BB.	94
Apéndice 2.	Resultados del análisis de suelo en el campo, Sub estación experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Isabela, 2014.	95
Apéndice 3.	Genotipos del panel de diversidad de tépari incluidos en las evaluaciones de BCMNV. Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015.	95
Apéndice 4.	Resultado de los marcadores SW13, SAP6, SU91, PveIF4E^2, SR2, SW12 de 68 líneas interespecíficas INB.	101
Apéndice 5.	Crecimiento de cultivos aislados a partir de nódulos de poblaciones interespecíficas, en medio YMA+Azul de Bromotimol, utilizando como control las diferentes cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.	103
Apéndice 6.	Gel de electroforésis con productos amplificados del gen *nod*C de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.	104
Apéndice 7.	Gel de electroforésis con productos amplificados del gen *rec*A de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*	104

I-INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es nativo de las regiones Andina y Mesoamericana de las Américas y representa la leguminosa de grano alimenticia más importante para el consumo humano. La mitad de la producción mundial es en América Latina, en donde este cultivo representa la fuente principal de proteína (Voysest, 2000).

Los rendimientos de frijol en América Latina y África son inferiores al potencial del mismo debido a diversos factores limitantes bióticos y abióticos, que incluyen enfermedades, plagas, sequía y baja fertilidad de los suelos (Rosas, 2003). En la mayoría de los casos, factores bióticos y abióticos convergen de forma conjunta, incrementando los riesgos y consecuentemente las pérdidas en rendimiento y/o calidad de la semilla.

El frijol tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) es una especie nativa del suroeste de los Estados Unidos, noroeste de México y Mesoamérica, que representa un cultivo potencial en zonas áridas y cálidas del mundo por su tolerancia a la sequía y las altas temperaturas. Germoplasma de frijol tépari con tolerancia a estreses múltiples, incluyendo altas temperaturas, sequía, resistencia a bacteriosis (causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y brúquidos (*Accanthoscelides obtectus* Say) ha sido seleccionado (Porch *et al*., 2013).

El uso de genotipos silvestres y especies relacionadas, como progenitores en los programas de mejoramiento, ha sido una estrategia para adaptar el frijol común a las condiciones del cambio climático (Porch *et al*., 2013) especialmente en las regiones donde las condiciones de altas temperaturas y poca lluviosidad son predominantes. El frijol tépari, juega un papel importante en

éstas zonas agrícolas, como cultivo y como donador de características de interés para el frijol común.

Prácticas que incrementen la eficiencia del uso de recursos naturales deben ser implementadas, especialmente en las zonas donde la disponibilidad de recursos es sub-óptima y las condiciones ambientales no son favorables. La simbiosis rhizobio-leguminosa es el proceso natural más importante para la obtención de nitrógeno en esta familia de plantas, contribuyendo con el 60-80% de la fijación de nitrógeno (Wang *et al*., 2005), en este proceso la bacteria se beneficia obteniendo una fuente de carbono y un ambiente favorable para sus funciones biológicas.

La fijación de nitrógeno en el frijol común puede incrementar cuando se utilizan cepas de *Rhizobium* efectivas como inoculantes en condiciones de suelos con baja fertilidad (Hungría, *et al*., 2003). La fijación biológica en el frijol tépari ocurre en simbiosis con cepas de *Bradyrhizobium* spp. (Mapp, 2008; Mohrmann, 2011).

La evaluación de un germoplasma representativo de la diversidad genética de este cultivo con diferentes cepas de *Bradyrhizobium* permitirá establecer la importancia de especificidad y la preferencia del frijol tépari con las diferentes especies de *Bradyrhizobium*, tales como: *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. diazoefficiens.* Esta información representa una base para el mejoramiento de la fijación biológica del nitrógeno en el frijol tépari y su uso como donante en híbridos interespecíficos con frijol común. La habilidad de frijol tépari para nodular bajo condiciones ambientales poco favorables, como altas temperaturas del suelo y estrés de sequía, puede reducir los efectos negativos debido a los cambios climáticos.

La transferencia de mayor tolerancia al estrés abiótico de frijol tépari al frijol común también es importante para abordar los problemas causados por cambios climáticos. La producción de frijol

tépari en condiciones adversas y la reducción de la dependencia a fertilizantes nitrogenados, a través de la contribución de técnicas eficientes en el uso de la fijación biológica del nitrógeno, puede contribuir a una producción más sostenible.

Uno de los aspectos más críticos que limita la expansión del cultivo del frijol tépari es su susceptibilidad al *Virus del Mosaico Común del Frijol* (BCMV-por sus siglas en inglés), *Virus Necrótico del Mosaico Común del Frijol* (BCNMV) y *Virus del Mosaico Dorado Amarillo del Frijol* (BGYMV*).* BCMV y BCMNV son potyvirus transmitidos por áfidos que pueden causar pérdidas significativas en el rendimiento (Gálvez y Morales, 1989). El BGYMV transmitido por mosca blanca, es un geminivirus que igualmente ha causado pérdidas en el frijol común, en América Central y el Caribe (Blair *et al*., 1995). La generación de líneas de mejoramiento con genes de resistencia múltiple, que confieren resistencia a un amplio espectro de virus, ha sido una prioridad para las programas de mejoramiento en Centroamérica y el Caribe (Beaver *et al*., 2014; Prophete *et al*., 2013; Rosas *et al.*, 2004; Beaver *et al*., 2003, Kelly *et al*., 1995).

II-OBJETIVOS

- Identificar cepas de *Bradyrhizobium* y genotipos de tépari que posean habilidad superior de FBN.
- Conducir un análisis filogenético de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* a través del análisis de secuencias de los genes *nod*C, *rec*A y *atp*D.
- Estudiar la fijación biológica del nitrógeno de líneas interespecíficas y líneas del panel de diversidad de tépari (TDP) e identificar líneas que nodulan eficientemente con *Bradyrhizobium*.
- Desarrollar una población interespecífica (*Phaseolus vulgaris* × *Phaseolus acutifolius*) usando progenitores de las dos especies que tengan alta capacidad de FBN.
- Evaluar líneas del panel de diversidad de tépari (TDP) por su respuesta a BCMNV.

III-REVISIÓN DE LITERATURA

III.1-Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es abundante en la naturaleza, pero no puede ser utilizado por las plantas en su forma elemental. Las plantas obtienen el nitrógeno (N) disponible del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. Existen dos procesos dentro del ciclo de nitrógeno, que ocurren en la fijación biológica del nitrógeno. El primero consiste en bacterias de vida libre en el suelo, que son capaces de reducir el nitrógeno a amonio y establecen relaciones con plantas leguminosas y otras no leguminosas y que por su capacidad se les denomina organismos diazótrofos. El otro es la fijación en simbiosis, que consiste en la habilidad de las bacterias llamadas colectivamente como rhizobios, de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, con la capacidad de inducir en la raíz (o tallo) de las leguminosas, la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, en donde el nitrógeno gaseoso (N_2) es reducido a amonio, por una enzima altamente conservada, la nitrogenasa. Por su parte la planta provee carbono y un ambiente favorable para el proceso de fijación (Wang *et al*., 2005).

La reducción de los efectos del cambio climático, es una meta importante para la sociedad moderna. La necesidad de incrementar la producción de alimentos conlleva un aumento en la demanda por nitrógeno, el costo de producción y potencialmente la contaminación de las aguas. Por lo tanto, la optimización del proceso de la FBN es esencial para reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de leguminosas (Olivares *et al*., 2013).

En los sistemas agrícolas, las asociaciones simbióticas entre leguminosas y rhizobios, representa una fuente importante de nitrógeno. Aunque algunos científicos sugieren que no se cuenta con suficiente información para hacer estimados confiables del N_2 fijado por leguminosas (Smil, 1999)

o que es producido por efectos ambientales y no dado por la planta (Giller, 2002), es posible calcular con un grado de precisión razonable, promedios en términos del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndfa), fijado por los cultivos de leguminosas más importantes (Herridge *et al*., 2008). Los valores de Ndfa en el frijol común para el año 2005 fueron aproximadamente 40%, mientras que para la soya [*Glycine max* L. (Merr.)] fue 68% (FAOSTAT, 2005). En términos generales, el mejoramiento y selección de leguminosas inoculadas con cepas previamente seleccionadas en suelos con poco N disponible ha producido los mejores resultados (Giller, 2002).

Un caso que resalta el impacto positivo de la FBN en la agricultura, es la producción de soya en Brasil, donde el uso de fijación de N_2 es actualmente uno de los componentes más importantes en el sistema de producción del cultivo. La mayoría de los agricultores utilizan prácticas de inoculación, constituido por cepas seleccionadas de *Bradyrhizobium* y técnicas de aplicación, en donde los rangos de N_2 fijado son aproximadamente 300 Kg N ha^{-1}, lo que representa más del 90% del nitrógeno total requerido por el cultivo.

Estos resultados superiores en la FBN de soya en Brasil en comparación con otros países (E.E.U.U., Argentina, Australia y China), son debido a la selección de líneas inoculadas con las mejores cepas seleccionadas disponibles (Hungría *et al*., 2006), la optimización de la compatibilidad de los inoculantes con las condiciones agroambientales, como la acidez de los suelos (Hungría y Vargas, 2000), en colaboración con fitomejoradores, microbiólogos, agrónomos y la educación de los agricultores de los beneficios de la inoculación, en conjunto con legislaciones que controlan el uso y la calidad de los inoculantes comerciales (Hungría *et al*., 2005).

III.2-Aspectos Moleculares de la FBN

En el proceso de infección rhizobio-leguminosa, muchos tejidos de las raíces estan envueltos, donde el primer signo es dado por la planta a través de metabolitos secundarios fácilmente reconocibles (flavonoides, isoflavonoides, betaínas), incluyendo los tejidos de la epidermis, el cortex y periciclo. En respuesta, los rhizobios sintetizan otra señal específica hacia la planta hospedera, los factores Nod (Dénarié *et al*., 1996). Es un proceso específico donde la raíz secreta señales específicas para atrapar los rhizobios. En el género *Rhizobium* los genes *nod*, *noe* y *nol* estan envueltos en la síntesis de factores Nod. Estos genes, con la excepción de *nod*D, no pueden expresarse si no reciben la señal específica de la planta (Spaink, 2000). Ambos la cantidad y la calidad de los factores Nod son importantes en determinar la especificidad del hospedero (Perret *et al*., 2000). Sin embargo, rhizobios que tienen diferentes genes *nod* y produciendo diferentes factores Nod pueden nodular efectivamente la misma especie de plantas, tal como es el caso con *Rizobium etli* y *Rhizobium tropici*, los cuales son ambos simbiontes del frijol común (Poupot *et al*., 1995).

Una vez los cambios han sido inducidos por los factores Nod, comienza la deformación o ramificación de los pelos de la raíz donde un nuevo crecimiento isotrópico causa en el pelo de la raíz un enrollamiento (Felle *et al*., 1999). Solamente algunos pelos radicales de la gran cantidad que logran completar su crecimiento, forman esa curvatura en la presencia de los factores Nod, en los que el contenido sea suficiente para redirigir el crecimiento del pelo (Esseling *et al*., 2003). Haciendo una curvatura de 360°, la bacteria queda atrapada, pero la función de enrollamiento todavia no se comprende por completo. Los rizobios inducen la degradación de la célula y la membrana plasmática de la célula de la planta invagina, la bacteria entra a la célula de la planta y la infección se ha iniciado (Geurts *et al*., 2005).

Los flavonoides están envueltos en muchas funciones tales como servir como antioxidantes, pigmentación, defensa en contra de los patógenos y envío de señales durante la simbiosis. La manipulación de sus rutas de síntesis ha sido sugerida como un mecanismo para mejorar la interacción, así como la alteración de los productos de los flavonoides por parte de microorganismos en el suelo. La superposición de las funciones en las rutas de síntesis de los flavonoides para sintetizar sus productos, de acuerdo a las condiciones del ambiente, también ha sido sugerida como uno de los mecanismos de adaptación de las plantas en el ambiente (Hassan y Mathesius, 2012).

Los géneros de bacterias noduladoras de leguminosas están filogenéticamente separados entre si de acuerdo con sus secuencias de 16S rDNA, donde algunas cepas están entremezcladas (Young y Haukka, 1996). Plásmidos con genes *nod* son llamados simbióticos o pSym y pueden ser un tercio del tamaño del cromosoma, mientras que tienden a ser más pequeños en cepas de *Rhizobium*, alrededor de 200-600kb (González *et al*., 1996). Su transferencia lateral, seguida por reordenamientos genéticos, están envueltos en la evolución de funciones simbióticas que explican las inconsistencias encontradas en los árboles filogenéticos correspondientes a genes *nod* (Wernegreen y Riley, 1999).

No se ha encontrado una congruencia completa en los árboles filogenéticos basados en genes *nod* y los basados en los genes 16S rRNA, pero los basados en genes *nod* han mostrado una mejor correlación con el rango de hospederos de la planta (Haukka *et al*., 1998). De acuerdo con los genes *nod*C y *nif*H, se han encontrado relaciones más estrechas dentro de los simbiontes de *Phaseolus vulgaris* y reestructuraciones genéticas han ocurrido dentro del género *Rhizobium*. Considerando la similaridad de los conglomerados (82-99.5%), un ancestro común podría ser

sugerido y una buena correspondencia entre el rango de hospederos y asociaciones basadas en *nod*C han sido encontradas (Laguerre *et al*., 2001).

La transferencia lateral de genes relacionados a la simbiosis dentro de lo rhizobios, que obedece a la adaptación de los hospederos, explica algunas de las incongruencias filogenéticas (Roger *et al*., 2011). El estudio de los genes *nod*Z y *nol*L, muestra que éstos han sido transferidos del género *Bradyrhizobium* a otros géneros. Se sugiere que fueron adquiridos después de los genes *nod*ABC, los cuales pueden haber favorecido la nodulación eficiente en hospederos asociados con *Bradyrhizobium* como la soya (Ormeño-Orrillo, *et al*., 2013).

Algunos genes conservados han sido estudiados con el fin de entender el impacto en la transferencia de genes y la interpretación de filogenias de genes individuales. El gen *rec*A, envuelto en la recombinación de ADN usado en análsis filogenéticos, es consistente con SSU (Young, 1998) y con los genes *atp*D, codificadores de la subunidad beta de la mebrana ATP sintetasa, que es esencial para la producción de energía (Kaneko *et al*., 2000).

Filogenias basadas en genes *atp*D y *rec*A, confirmaron la clasificación basada en SSU, cuando se estudiaron 25 tipos de cepas de 5 géneros de rhizobios, incluyendo *Bradyrizobium* y *Rhizobium*, sugiriendo que las comparaciones de secuencias de genes conservados, proveen un método robusto para análisis filogenético (Gaunt *et al*., 2001).

Un total de 169 cepas de *Bradyrhizobium* de la colección de SEMIA en Brasil, aisladas de diferentes leguminosas, fueron estudiadas con secuencias basadas en análsis multilocus del gen 16 rRNA, la región ITS y los genes *gln*ll, *rec*A y *dna*K. Un análisis de secuencias multilocus (MLSA) de los 4 genes conservados, tuvo resultados similares a los obtenidos cuando se analizó 16S rRNA e ITS y mostraron la variabilidad más alta cuando se amplificó el gen *atp*D; sugiriendo la utilidad

del uso de este método para proveer información filogenética y en el estudio de nuevas especies (Menna *et al*., 2009).

Un grupo de cepas de *Rhizobium*, aisladas de la variedad de frijol común 'Jose Beta', fueron estudiadas en República Dominicana, donde se estudió la similaridad de las secuencias basado en los genes *rec*A, *atp*D y *nod*C. A través de la comparación de estas secuencias, se demostró que *Rhizobium phaseoli* sv. phaseoli y *Rhizobium etli* sv. phaseoli son originarias de América y subsequentemente se intodujeron a la isla Española. A través del análisis de las secuencias *nod*C, el origen americano fue también demostrado cuando se determinó que este alelo se encontró más tarde en los aislados de Europa (Díaz-Alcántara *et al*., 2013).

III.3-Fijación Biológica de Nitrógeno en Frijol Común

El frijol común nodula con un grupo de especies de *Rhizobium* de rápido crecimiento que nodulan diferentes leguminosas en las diferentes regiones templadas y tropicales. Cepas seleccionadas de *Rhizobium etli* (Segovia *et al*., 1993), han sido extensamente reportadas por sus habilidades de nodulación, ocupancia de nódulos y capacidad de competir con otras cepas. Alrededor del 60% de 820 accesiones de frijol común, evaluadas en Honduras, inoculadas con la cepa KM 6001, mostraron una ocupancia del 80-100% en la presencia de cepas nativas del suelo (Rosas *et al*., 1998).

Rhizobium tropici (Martínez-Romero *et al*., 1991) incluye también un grupo importante de cepas estudiadas en diferentes sistemas de cultivo y bajo diferentes condiciones de estreses abióticos. La cepa CIAT 899, también codificada como CIAT 899, UMR 1899, ha mostrado tolerancia a suelos ácidos (pH 4.0) y altas temperaturas (Graham *et al*., 1994). Los beneficios de inocular el frijol común con esta especie, han sido demostrados también en experimentos establecidos bajo

condiciones de baja fertilidad del suelo en la presencia de altas concentraciones de rhizobios nativos. Después de 5 inoculaciones en el mismo sitio con la cepa CIAT 899 y PRF 81 (*R. tropici*-previamente seleccionada en la localidad en Brasil), se encontró que la ocupancia de estas cepas incrementó en los nódulos de 28% a 56% (Hungria *et al*., 2003).

La competencia de ambas especies y su persistencia ha sido también evaluada con la cepa CIAT 899 y la cepa W16.3SB (*Rhizobium etli*), usando el cultivar de frijol común 'Carioca' en observaciones durante 3 años consecutivos. La población de rhizobios en el suelo, incrementó de 30 a 10^4 g^{-1} después de 2 años sin inoculaciones repetidas, en donde casi un 100% de la ocupancia en el primer año, fue por cepas inoculadas con mayor persistencia de la cepa CIAT 899 (Vlassak *et al*., 1996).

Se encontró una marcada afinidad de los genotipos de frijol común, de nodular con las cepas correspondientes a sus respectivos centros de origen, sugiriendo una coevolución entre *Rhizobium* y el frijol común (Aguilar *et al*., 2004). En adición, otras especies han sido reclasificadas como nuevos grupos filogenéticos, como *Rhizobium grahamii* (Althabegoiti *et al*., 2014), la cual ha mostrado ser una cepa poco competidora con las cepas superiores de *R. etli* y *R. tropici*.

III.4-Frijol tépari (*Phaseolus acutfolius* A. Gray)

El uso eficiente de agua es una prioridad para alimentar una población humana en constante crecimiento, donde actualmente el 80% del agua dulce utilizada por el ser humano es utilizada en la agricultura. Una de las herramientas más importantes es el desarrollo de cultivos con mejor adaptación a altas temperaturas y sequía (Jury y Vaux, 2007).

El frijol tépari tiene un alto potencial como cultivo en zonas áridas en los países del trópico durante la época seca con altas temperaturas. El frijol común ha mostrado una reducción drástica o ausencia

de producción de semilla en este tipo de ambiente (Miklas *et al*., 1994). Veinticinco líneas de frijol tépari (de la colección de *Phaseolus acutifolius* de USDA) fueron evaluadas bajo condiciones de altas temperaturas en condiciones controladas en invernadero (NY, E.E. U.U.) mostrando la capacidad de producir un número considerable de vainas (Rainey y Griffiths, 2005).

La tolerancia al calor del frijol tépari y frijol común, fueron evaluados en ausencia de estrés de agua en cámaras de crecimiento. La germinación de semillas fue reducida alrededor del 11% a 32 ℃, comparado con germinación a 25 ℃ para ambas especies y el crecimiento radicular inicial, no fue afectado en *P. acutifolius*, pero si afectó la aparición de primeras estructuras basales en las raíces en frijol común (Lin y Markhart, 1990).

El frijol tépari tiene raíces profundas para evitar la deshidratación, un sistema foliar dosel que consiste de hojas pequeñas para reducir el uso de agua y un ajuste estomatal para reducir el estrés de sequía (Beebe *et al*., 2013). Experimentos conducidos en invernadero bajo condiciones de estrés de sequía, utilizando cilindros con suelo, mostraron la velocidad con la cual pueden acceder a reservas de agua limitada rápidamente (Butare *et al*., 2011). Otras investigaciones indican que su desempeño superior bajo condiciones de sequía y altas temperaturas, puede ser atribuido a la habilidad de movilizar fotosintatos de las hojas y tallos a la semilla (Rao *et al*., 2013). Germoplasma mejorado de frijol tépari ha sido desarrollado (Porch *et al*., 2013) con tolerancia a múltiples estreses abióticos como sequía y altas temperaturas, resistencia a bacteriosis común (causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) y brúquidos (*Accanthoscelides obtectus* Say).

III.5-Fijación Biológica de Nitrógeno en Frijol Tépari

El frijol tépari tiene una alta especificidad de nodular con cepas de *Bradyrhizobium* para una nodulación efectiva (Somasegaran y Hoben, 1991). Cuatro genotipos fueron evaluados con 10 aislados de *Bradyrhizobium* y 6 de *Rhizobium*. Las cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de *Psophocarpus tetragonolobus*, *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*, nodularon efectivamente con tépari. Los aislados de *Bradyrhizobium* de *Vigna unguiculata*, *Acacia mearnsii*, *Crotalaria sp*., *Pachyrrhizus erosus*, *Macrotyloma sp*. y *Arachis hypogaea*, y de *Rhizobium* de *Leucaena leucocephala* y *Phaseolus vulgaris*, no tuvieron una nodulación efectiva; los aislados de *Glycine max*, *Vigna radiata*, *Medicago sativa* no presentaron ninguna nodulación en tépari.

Bradyrhizobium, es un género de bacteria con crecimiento lento, incluye las especies *B. elkanii* (Kuykendall *et a*l., 1993), *B. japonicum* (Jordan, 1982), y el recientemente reclasificado grupo de *B. japonicum* (USDA 110) como *B. diazoefficiens* (Delamuta *et al*., 2013). Estudios con 3 líneas de tépari se condujeron para evaluar 15 aislados de *Bradyrhizobium*, resultando como superiores las cepas UMR 3007, UMR 3043, USDA 3254, de acuerdo con el número de nódulos, tamaño de nódulos y lecturas de clorofila (Mohrmann, 2011).

III.6-Nodulación en híbridos interespecíficos

La generación de híbridos interespecíficos (*P. vulgaris* × *P. acutifolius*) es una herramienta en el mejoramiento para la introgresión de las características del frijol tépari, como el uso más eficiente de agua y mejor FBN al frijol común. La especificidad de *Rhizobium* con líneas interespecíficas fue relacionada con el padre recurrente y la generación. Las generaciones tempranas nodularon de acuerdo con el tipo correspondiente a su padre recurrente, las generaciones avanzadas nodularon

con ambas especies (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*), con 90% de ocupancia por la cepa CIAT 899, probablemente porque en todos los híbridos, se utilizó *Phaseolus vulgaris* como el parental materno y el último cruce fue hecho con frijol común (Estévez de Jensen, 1991).

Las interacciones simbióticas de las líneas derivadas de cruzamientos entre *P. acutifolius* × *P. vulgaris,* en simbiosis con *Bradyrhizobium* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli,* fueron estudiadas bajo condiciones de invernadero (Somasegaran y Hoben, 1991). Peso seco del follaje, peso seco de nódulos, actividad total de nitrogenasa (C_2H_4 por planta por hora) y nitrógeno total en el follaje fueron medidos en este estudio. Cinco de los 7 híbridos evaluados nodularon y fijaron N_2 eficientemente con *Bradyrhizobium* y las otras dos líneas con *Rhizobium*. El inóculo usado de *Rhizobium* fue una mezcla de las cepas TAL 182, TAL 1383 (CIAT 632), TAL 1797 (CIAT 899) y el de *Bradyrhizobium* fue una mezcla de las cepas TAL 336 (USDA 3255), TAL 644 (CIAT 257), TAL 648 (UMKL 57).

III.7-Aspectos de la generación de híbridos interespecíficos

La hibridación entre tépari y frijol común tiene un éxito alrededor del 5% (Mejía-Jiménez *et al*., 1994) porque la mayoría de las progenies que se obtienen son estériles, teniendo dificultad para formar las semillas y abortando en los siguientes 20-25 días despues de la polinización. Técnicas para la recuperación de embriones con cultivo *in vitro,* han aumentado el porcentaje de embriones viables (Ferwerda *et al*., 2003). Las plantas que sobreviven a menudo presentan anormalidades como retraso en el crecimiento y marchitez, obteniéndose en algunos casos flores al cabo de los 60 días después de la germinación (Parker y Michaels, 1986). Lo híbridos pueden producir flores, sin embargo la fertilidad del polen es baja, alrededor del 8% (Rabakoarihanta *et al*., 1982).

La retrocruzas de la generación F_1 hacia el parental de frijol tépari incrementa la fertilidad (como hembra o como macho). Genotipos específicos como 'ICA Pijao', contribuyen a incrementar el porcentaje de éxito cuando se utilizan para este tipo de hibridación (Kusolwa y Myers, 1991).

Debido a la baja producción de polen en los híbridos, se recomienda utilizar el híbrido F_1 como el parental femenino en la retrocruza. Tratamientos con colchicina han sido utilizados, produciendo semilla alotetraploides para reemplazar las técnicas de cultivo *in vitro* e incrementar la fertilidad (Somasegaran y Hoben, 1991).

Otras técnicas de producir híbridos interespecíficos sin rescate de embriones han sido evaluados, utilizando como parentales de frijol común 'ICA Pijao', 'Sierra' y 'Regalfin' y las líneas de tépari PI 321637-s y PI 321638-s. Solamente 10-20% de la semilla F_1 producida fue viable. En este estudio, el período de floración de las plantas F_1 fue aproximadamente 60 días, y semillas viables fueron producidas retrocruzando a citoplasma de tépari (Ferwerda et al, 2003).

Se realizaron estudios para evaluar la compatibilidad entre ambas especies, utilizando 9 líneas de *Phaseolus vulgaris* como el parental femenino y 7 líneas de *Phaseolus acutifolius* como parentales masculinos, cultivándose un total de aproximadamente 1400 embriones, de los cuales aproximadamente 200 llegaron a ser plantas adultas. Se observó que el desarrollo de las plantas depende de la presencia de los genes dominantes DL_1 (presente en los tipos de semilla pequeña) y DL_2 (presente en los tipos de semilla mediano-grande) portado por el padre *P.vulgaris* que genera una incompatibilidad interespecífica, sin importar cual sea el padre de *P. acutifolius*. Los cultivares 'ICA Pijao' y 'Sacramento Light Red Kidney' no mostraron la presencia de dicho alelo (Parker y Michaels, 1986).

III.8-*Virus del Mosaico Común del Frijol* (BCMV) en el frijol tépari

En el frijol común, las primeras formas de resistencia dominante al BCMV se reportaron en el cultivar 'Corbett Refugee' (Pierce, 1935), demostrándose después que dicho gen, en la presencia de ciertas cepas del virus provocaba una reacción de necrosis vascular (Grogan y Walker, 1948). Dicho síntoma fue confirmado (Drijfhout, 1978) mostrando que el gen *I* es el responsable de la reacción necrótica cuando es infectado con las cepas NL 2 y NL 6 de BCMV y todas las cepas de BCMNV, NL 3, NL 5 y NL 8. Adicionalmente, se encontró que todas las cepas de BCMNV pueden causar necrosis por debajo de los 26ºC, contrario a las cepas de BCMV que necesitan esta temperatura para la expresión de dicho síntoma. El mecanismo de resistencia a las cepas necróticas es una respuesta hipersensitiva, en donde el gen *I* previene los síntomas de mosaico. La inmunidad completa a las diferentes cepas de BCMV y BCMNV fue encontrada en la línea IVT 7214, que poseía el gene recesivo *bc-3*.

El BCMV, es transmitido por semilla en el frijol tépari. Cuatro accesiones de este cultivo: PI 200749, PI 310800, PI 310802, PI 321637, fueron reportadas por transmitir el virus con índices entre 7 a 22%. Las 15 accesiones evaluadas fueron susceptibles a la infección con las 3 cepas de virus, dos de ellas provenientes del estado de Nueva York, E.E. U.U.: NY67-85 y NY 68-95; y una cepa proveniente de México. Se encontró que el virus es acarreado en el embrión de la semilla, pero no en la testa (Provvidenti y Cobb, 1975).

IV-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1-Selección de cepas de *Bradyrhizobium*

Las evaluaciones de selección de cepas de *Bradyrhizobium* fueron conducidas en invernadero en la Estación de Investigación de Agricultura Tropical (USDA-ARS-TARS en Mayagüez, PR) localizada 18°12'28.5"N y 6°08'18.2"O. Las cepas de *Bradyrhizobium* USDA 110 (*B. diazoefficiens*), USDA 94 *(B. elkanii*), USDA 3254 (*B. elkanii*), USDA 3 (*B. japonicum*), USDA 76 (*B. elkanii*), USDA 73 (*B. japonicum*), USDA 122 (*B. japonicum*), USDA 123 (*B. japonicum*), EAPBAN (*Bradyrhizobium* spp.) y EAP 1001 (*Bradyrhizobium* spp.) fueron utilizadas para inocular 20 genotipos de tépari (Tabla 1), seleccionados de la colección internacional del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y 5 controles: TARS-Tep 22 y 4 genotipos of caupí (*Vigna unguiculata*) seleccionados basados en su rendimiento en el campo (David *et al*., 2010).

Las semillas fueron mecánicamente escarificadas y desinfectadas con cloro al 5% (v/v) y sembradas en bancos con arena previamente esterilizada con cloro al 20% (v/v). Las plantas fueron inoculadas de forma individual en la base del tallo con inoculante líquido de cada cepa, utilizando 1 ml/planta a una concentración de 10^6 células de rhizobios/ml a los 4 días después de siembra. Para la preparación del inóculo, se utilizaron cultivos puros de cada una de las cepas, crecidas durante 72 horas en placas petri con medio Agar Levadura Mannitol (YMA-SIGMA-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.E. U.U.) conteniendo 10 g of mannitol, 0.5 g K_2HPO_4, 0.2 g

Tabla 1. Características de los genotipos inoculados con diferentes cepas de *Bradyrhizobium* en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Genotipo	Especie	País	Color de semilla	Peso 100 semillas (g)
G40010[ϯϯ]	*P.acutifolius*	El Salvador	Blanco	14.5
G40022A	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Rosado	16.2
G40035	*P.acutifolius*	México	Negro	10.5
G40036	*P.acutifolius*	México	Negro	12
G40078	*P.acutifolius*	EE. UU.	Crema/negro/otro	1.9
G40087	*P.acutifolius*	México	Crema/negro/otro	4.2
G40107	*P.acutifolius*	México	Crema/negro/otro	5.2
G40122	*P.acutifolius*	Zambia	Blanco	17.8
G40128	*P.acutifolius*	México	Blanco	13.7
G40177D	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Crema/amarillo	9
G40177E3	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Crema/negro/otro	4.8
G40179	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Crema/negro/otro	2.8
G40198	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Crema/negro/otro	4.3
G40207	*P.acutifolius*	E.E. U.U.	Crema/negro/otro	1.7
G40222	*P.acutifolius*	EE. UU.	Crema/negro/otro	2.5
G40232	*P.acutifolius*	México	Crema/café	15.9
G40235	*P.acutifolius*		Crema/negro/otro	3.2
G40258	*P.acutifolius*	México	Crema/negro/otro	2.8
G40295	*P.acutifolius*	México	Crema/negro/otro	4.1
G40301	*P.acutifolius*	Zimbawbe	Blanco	10.9
Controles				
TARS-Tep 22	*P.acutifolius*		Blanco	11.5
524B	*Vigna unguiculata*	EE. UU.	Crema	18
Apagbaala	*Vigna unguiculata*	África oeste	Blanco	11
IFE Brown	*Vigna unguiculata*	África oeste	Café	11
Mouride	*Vigna unguiculata*	África oeste	Café	14

[ϯϯ] Accesiones de germoplasma de la colección de frijol tépari de CIAT.

$MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g NaCl, 0.5 g extracto de levadura, 10 g de agar y 1 litro de agua a pH 6.8, autoclavado a 121°C y 15 psi (Somasegaran y Hoben, 1994).

Las colonias fueron transferidas individualmente a Caldo Levadura Manitol (YMB- SIGMA-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.E. U.U.), con los mismo constituyentes del YMA (sin agar) y

cultivado en agitación constante durante 72 horas a 160 rpm en un agitador (Innova 2000-New Brunswish Scientific, Edison, NJ, E.E. U.U.) a temperatura ambiente. Previo a la inoculación, se contaron las colonias con un hemacitómetro (1/4000 mm^2, Hausser Scientific, Horsham, PA, E.E. U.U.) para asegurar el inóculo mínimo requerido para tener infección (10^6 células/ml) y la misma concentración de cada cepa. Solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dilworth, 1970; Somasegaran and Hoben, 1994) fue aplicada desde el día de la inoculación hasta el día de la toma de datos (4 semanas después de siembra). Número de nódulos, peso fresco y seco (mg) de cada unidad experimental fueron evaluados. Para los pesos, se cortó la parte vegetativa de cada planta en la base del tallo, las raíces se removieron cuidadosamente de la arena con una pala manual y se lavaron con agua. Los nódulos fueron separados de las raíces con pinzas, se contaron y se almacenaron en tubos de 2 ml para ser pesados en una balanza de precisión (Mettler Toledo, AB104-S/FACT). El experimento se arregló en un diseño de bloques completamente al azar (RCBD) con un total de 3 bloques y 3 plantas en cada unidad experimental, para cada cepa. Los datos fueron analizados usando un ANOVA y la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS-$P \leq 0.05$) usando el programa estadístico Infostat©. Para cada una de las cepas se practicó dos análisis, incluyendo y excluyendo los controles de las otras especies, con el objetivo de observar el desempeño de las cepas con las diferentes especies y el desempeño de las cepas específicamente con el frijol tépari.

IV.2-Selección de genotipos de frijol tépari

Se evaluaron 182 genotipos de frjiol tépari (*Phaseolus acutifolios* A.Gray) de la colección de germoplasma de *Phaseolus* spp. de CIAT (Tabla 2), y 25 genotipos de tépari del programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS. De los 182 genotipos de la colección de germoplasma de CIAT, 110 fueron accesiones cultivadas, 6 semi-domesticados y 66 silvestres, categorías que se

definieron por el peso y características morfológicas de la semilla. Las plantas fueron inoculadas con una mezcla de 2 cepas superiores, seleccionadas en el estudio previo por tener los valores más altos en número de nódulos y peso. La misma metodología para la preparación de inóculo del experimento anterior y los mismos parámetros de evaluación, fueron utilizados.

Tabla 2. Genotipos de la colección de CIAT, peso de 100 semillas (g), país de origen y región, evaluados para identificar genotipos superiores, por sus valores de nodulación inoculados con las cepas USDA 110 + USDA 3254 de *Bradyrhizobium* en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Genotipo	Peso 100 semillas (g)	País de Origen	Región	Genotipo	Peso 100 semillas (g)	País de Origen	Región
G40001	16.1	México	Veracruz	G40176	16.4	E.E. U.U.	Arizona
G40006B	15.2	México	Chiapas	G40177A	8.6	E.E. U.U.	Arizona
G40008	16.8	Marruecos	-	G40177A1	10.5	E.E. U.U.	Arizona
G40009	16	El Salvador	Santa Ana	G40177A2	9.8	E.E. U.U.	Arizona
G40010	14.5	El Salvador	San Miguel	G40177B1	10.1	E.E. U.U.	Arizona
G40012	14.2	Nicaragua	Chinandega	G40177C	8	E.E. U.U.	Arizona
G40013A	14.3	Nicaragua	Rivas	G40177D	9	E.E. U.U.	Arizona
G40013D	14.8	Nicaragua	Rivas	G40177E	8.2	E.E. U.U.	Arizona
G40018	14.7	México	Chiapas	G40177E1	6	E.E. U.U.	Arizona
G40020	13.9	México	Sonora	G40177E2	12.5	E.E. U.U.	Arizona
G40021	13.8	México	Jalisco	G40177E3	4.8	E.E. U.U.	Arizona
G40022	15.3	E.E. U.U.	Arizona	G40177F	9	E.E. U.U.	Arizona
G40022A	16.2	E.E. U.U.	Arizona	G40177G	10.7	E.E. U.U.	Arizona
G40023	15.8	E.E. U.U.	Arizona	G40179	2.8	E.E. U.U.	Arizona
G40025	18.4	E.E. U.U.	Arizona	G40181	2.9	E.E. U.U.	Arizona
G40028	14.8	E.E. U.U.	-	G40189	3.3	México	Michoacán
G40029	16.7	E.E. U.U.	-	G40191	2.8	E.E. U.U.	N. México
G40030	18.2	E.E. U.U.	Arizona	G40192	6.2	México	Sonora
G40032	15.2	Guatemala	Zacapa	G40194	6.4	México	-
G40034	14.9	México	Nayarit	G40196	4.3	E.E. U.U.	Texas
G40035	10.5	México	Oaxaca	G40198	4.3	E.E. U.U.	Texas
G40036	12	México	Oaxaca	G40199	4.4	México	Zacatecas
G40037	16.8	E.E. U.U.	Arizona	G40200	14.5	Costa Rica	Guanacaste

G40037A	17.5	E.E. U.U.	Arizona	G40201	13.9	Costa Rica	Guanacaste
G40038	14.2	México	Sonora	G40202	2.9	México	Durango
G40039	13.7	México	Chiapas	G40204	2	E.E. U.U.	Arizona
G40040	17.4	E.E. U.U.	Arizona	G40206	4.4	México	Durango
G40041	15.5	Suráfrica	-	G40207	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40042	20.6	E.E. U.U.	Nebraska	G40212	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40043	15.4	Nicaragua	-	G40213	1.9	E.E. U.U.	Arizona
G40057	16.9	-	-	G40213A	2.4	E.E. U.U.	Arizona
G40058	12.7	El Salvador	San Miguel	G40221	2.2	E.E. U.U.	Arizona
G40060	13.8	-	-	G40222	2.5	E.E. U.U.	Arizona
G40061	13.3	El Salvador	Sonsonate	G40224	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40066A	15.9	E.E. U.U.	Arizona	G40227	3	E.E. U.U.	Arizona
G40067	17.6	E.E. U.U.	Arizona	G40228	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40068	18	E.E. U.U.	Arizona	G40231	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40073	4.2	México	Sonora	G40232	15.9	México	Chiapas
G40074	6	México	Sonora	G40233	2.2	E.E. U.U.	Arizona
G40076	2.9	E.E. U.U.	N. México	G40234	21.6	E.E. U.U.	Wyoming
G40078	1.9	E.E. U.U.	Texas	G40235	3.2	-	-
G40081	2.3	México	Durango	G40236	2.1	México	Durango
G40082	3.8	México	Chihuahua	G40237	17.1	México	Coahuila
G40083	4.3	México	Durango	G40237A	16	México	Coahuila
G40087	4.2	México	Durango	G40238	16.2	México	Coahuila
G40089	4.4	México	Durango	G40245	2.6	México	Michoacán
G40095	3.6	México	Durango	G40248	2.2	México	Chihuahua
G40096	3.7	México	Durango	G40258	2.8	México	-
G40100	4.8	México	Durango	G40258A	2.8	México	-
G40103	4	México	Sinaloa	G40261	1.9	México	-
G40105	3.8	México	Jalisco	G40262	3	México	-
G40106	6.3	México	Jalisco	G40269	15.5	México	Chiapas
G40107	4.2	México	Jalisco	G40270	15.9	México	Chiapas
G40108	3.2	México	Durango	G40271	19	México	Chiapas
G40110	15	México	Campeche	G40272	15.5	México	Sonora
G40111	16.3	México	Campeche	G40273	2.2	México	Chihuahua
G40112	16.1	México	Durango	G40274	5.4	México	B. Calif. Sur

G40113	2.4	E.E. U.U.	Arizona	G40275	15	México	Sonora
G40115	7.4	México	Sonora	G40276	14.4	México	Sonora
G40116	7.4	México	Sonora	G40277	15.2	México	Sonora
G40117	2.3	E.E. U.U.	-	G40279	15.2	México	Sonora
G40119	14.2	México	Oaxaca	G40282	18.2	E.E. U.U.	Arizona
G40120	15.8	México	Sinaloa	G40283	16.2	E.E. U.U.	Arizona
G40122	17.8	Zambia	Prov. Este	G40284	27.2	E.E. U.U.	Arizona
G40125	16.3	México	Sinaloa	G40285	2.7	México	Veracruz
G40127	13.9	México	Sinaloa	G40289	3	México	Sonora
G40128	13.7	México	Sinaloa	G40290	3.7	México	Sinaloa
G40129	13.4	México	Sinaloa	G40294	4.6	México	Sinaloa
G40130	12.6	México	Sinaloa	G40295	4.1	México	Sinaloa
G40138	13	México	Sinaloa	G40296	6	México	Sinaloa
G40140	13.7	México	Sinaloa	G40297	5.2	México	Sinaloa
G40141	13.5	México	Sinaloa	G40298	4	México	Guerrero
G40142	16.8	México	Sonora	G40299	12.6	Guatemala	Guatemala
G40142A	15.2	México	Sonora	G40300	13.2	El Salvador	Santa Ana
G40143	13.4	México	Sonora	G40301	10.9	Zimbabue	Manicaland
G40144	13.2	México	Sonora	G40302	9.2	Zimbabue	Mashonaland
G40144A	15.2	México	Sonora	G40303	13.9	Nicaragua	Rivas
G40144B	16.3	México	Sonora	G40304	17.2	E.E. U.U.	
G40144C	13.7	México	Sonora	4257[β]		Tep 6[ω]	
G40145	13.8	México	Sonora	4263		Tep 23	
G40146	14.4	México	Sonora	4279		Tep 23	
G40147	14.6	México	Sonora	4288		Tep 6	
G40148	16.4	México	Sonora	9800-1	14.2	Tep 23 × 10IS-2423	
G40149	13.4	México	Sonora	9800-2	11.5	Tep 23 × 10IS-2423	
G40150	13.6	México	Sonora	9801-1	16.9	Tep 23 × 10IS-2423	
G40151	14.3	México	Sonora	9801-2	17.4	Tep 23 × 10IS-2423	
G40152	15.1	México	Sonora	9803-1	16.4	Tep 4 (T-1-s) × PR1217-17	
G40153	16.6	México	Sonora	9805-1	17.3	Tep 6 × PR1217-20	
G40154	14.9	México	Sonora	9805-2	16.9	Tep 6 × PR1217-20	
G40156	17	México	Sonora	9806-1	16.7	Tep 6 × PR1217-20	
G40157	15.5	México	Sonora	9807-1	14.2	Tep 22 × VAX 6	

G40158A	16.8	México	Sonora	9807-2	17.9	Tep 22 × VAX 6
G40160	16.4	México	Sonora	9808-1	13.6	Tep 23 × 10IS-2423
G40162	15.8	México	Sonora	9808-2	17.4	Tep 23 × 10IS-2423
G40163	14.1	México	Sonora	9809-1	11.1	Tep 23 × 10IS-2423
G40164	14.7	México	Sonora	9809-2	12.2	Tep 23 × 10IS-2423
G40165	14.5	México	Sonora	9811-1	10.3	Tep 6 × PR1217-16
G40166	14.3	México	Sonora	9810-1	17.1	Tep 22 × 10IS-2423
G40173	15	México	Sonora	9811-2	16.9	Tep 6 × PR1217-16
G40173A	19.3	México	Sonora	9812-1	17.3	Tep 6 × PR1217-16
G40173C	16.1	México	Sonora	9812-2	17.2	Tep 23 × PR1217-17
G40174	15.6	México	Sonora	9813-1	16.8	Tep 23 × PR1217-17
G40175	18.6	E.E. U.U.	Arizona	9813-2	17.1	Tep 23 × PR1217-17

[ß] líneas 12SH del programa de mejoramiento del USDA-ARS-TARS, [ω] Pedigree de las líneas; - información desconocida.

Un segundo experimento, realizado en las mismas instalaciones en USDA–ARS-TARS, en bancos con arena, con los genotipos cultivados del Panel de Diversidad de Tépari (TDP), fue conducido (Tabla 3), incluyendo genotipos de la colección internacional de CIAT y USDA, inoculados con la cepa USDA 3254. Los mismos procedimientos fueron utilizados para preparación de inóculo, control de calidad e inoculación descritos anteriormente, con la cepa que tuvo los valores más altos para los parámetros evaluados en la selección de cepas. En este experimento se incluyeron 151 líneas cultivadas, 7 líneas silvestres, 3 líneas mejoradas del programa de USDA-ARS-TARS y la variedad 'Verano'. Se analizaron las raíces de las plantas a los 21 días después de la inoculación extrayendo la raíz con una pala manual y se tomaron los datos de nódulos de 0 a 3 cm (área de la corona) y de 3 a 10 cm (resto de la raíz), en ambas secciones se contó la cantidad de nódulos y el peso fresco y seco de los nódulos (mg). Ambos experimentos fueron sembrados arreglados en un diseño de bloques completamente al azar (RCBD), con 3 bloques y 4 plantas de cada genotipo en

cada bloque. Los datos fueron analizados usando un ANOVA y la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS-P≤0.05) usando el programa estadístico Infostat©.

Tabla 3. Genotipos cultivados del panel de diversidad de tépari (TDP), país y región, evaluados para identificar genotipos superiores por sus características de nodulación con la cepa USDA 3254 en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Genotipo	País	Región	Genotipo	País	Región
G40001	México	Veracruz	G40172	E.E. U.U.	Arizona
G40006B	México	Chiapas	G40173	México	Sonora
G40008	Marruecos	-	G40173A	México	Sonora
G40009	El Salvador	Santa Ana	G40173B	México	Sonora
G40010	El Salvador	San Miguel	G40173C	México	Sonora
G40012	Nicaragua	Chinandega	G40174	México	Sonora
G40013A	Nicaragua	Rivas	G40175	E.E. U.U.	Arizona
G40013D	Nicaragua	Rivas	G40176	E.E. U.U.	Arizona
G40018	México	Chiapas	G40177A	E.E. U.U.	Arizona
G40019	México	Oaxaca	G40177A1	E.E. U.U.	Arizona
G40020	México	Sonora	G40177A2	E.E. U.U.	Arizona
G40021	México	Jalisco	G40177B1	E.E. U.U.	Arizona
G40022	E.E. U.U.	Arizona	G40177C	E.E. U.U.	Arizona
G40022A	E.E. U.U.	Arizona	G40177D	E.E. U.U.	Arizona
G40023	E.E. U.U.	Arizona	G40177E	E.E. U.U.	Arizona
G40025	E.E. U.U.	Arizona	G40177E2	E.E. U.U.	Arizona
G40028	E.E. U.U.	-	G40177E3	E.E. U.U.	Arizona
G40029	E.E. U.U.	-	G40177F	E.E. U.U.	Arizona
G40030	E.E. U.U.	Arizona	G40177G	E.E. U.U.	Arizona
G40032	Guatemala	Zacapa	G40200	Costa Rica	Guanacaste
G40034	México	Nayarit	G40201	Costa Rica	Guanacaste
G40035	México	Oaxaca	G40206	México	Durango
G40036	México	Oaxaca	G40228	E.E. U.U.	Arizona
G40037	E.E. U.U.	Arizona	G40229	E.E. U.U.	Arizona
G40037A	E.E. U.U.	Arizona	G40230	E.E. U.U.	Arizona
G40038	México	Sonora	G40232	México	Chiapas
G40039	México	Chiapas	G40234	E.E. U.U.	Wyoming
G40040	E.E. U.U.	Arizona	G40237	México	Coahuila
G40041	Suráfrica	-	G40237A	México	Coahuila

G40042	E.E. U.U.	Nebraska	G40238	México	Coahuila
G40043	Nicaragua	-	G40261	México	Veracruz
G40057	-	-	G40263	México	Sonora
G40058	El Salvador	San Miguel	G40269	México	Chiapas
G40059	El Salvador	Santa Ana	G40270	México	Chiapas
G40060	-	-	G40271	México	Chiapas
G40061	El Salvador	Sonsonate	G40272	México	Sonora
G40062	Nicaragua	-	G40273	México	Chihuahua
G40066A	E.E. U.U.	Arizona	G40275	México	Sonora
G40067	E.E. U.U.	Arizona	G40276	México	Sonora
G40068	E.E. U.U.	Arizona	G40277	México	Sonora
G40110	México	Campeche	G40279	México	Sonora
G40111	México	Campeche	G40282	E.E. U.U.	Arizona
G40112	México	Durango	G40283	E.E. U.U.	Arizona
G40119	México	Oaxaca	G40284	E.E. U.U.	Arizona
G40120	México	Sinaloa	G40299	Guatemala	Guatemala
G40122	Zambia	Provincia E.	G40300	El Salvador	Santa Ana
G40125	México	Sinaloa	G40301	Zimbabue	Manicaland
G40127	México	Sinaloa	G40302	Zimbabue	Mashonaland
G40128	México	Sinaloa	G40303	Nicaragua	Rivas
G40129	México	Sinaloa	G40304	E.E. U.U.	-
G40130	México	Sinaloa	PI 440785	México	Sonora
G40138	México	Sinaloa	PI 440792	México	Sonora
G40140	México	Sinaloa	PI 440793	México	Sonora
G40141	México	Sinaloa	PI 440798	E.E. U.U.	Arizona
G40142	México	Sonora	PI 440800	E.E. U.U.	Arizona
G40142A	México	Sonora	PI 440801	E.E. U.U.	Arizona
G40143	México	Sonora	PI 440802	E.E. U.U.	Arizona
G40144	México	Sonora	PI 440805	E.E. U.U.	Arizona
G40144A	México	Sonora	PI 440806	E.E. U.U.	Arizona
G40144B	México	Sonora	PI 458873	E.E. U.U.	Maryland
G40144C	México	Sonora	PI 458874	E.E. U.U.	Puerto Rico
G40145	México	Sonora	PI 462026	E.E. U.U.	Arizona
G40146	México	Sonora	PI 476858	México	Sonora
G40147	México	Sonora	PI 477033	E.E. U.U.	Arizona
G40148	México	Sonora	PI 477035	E.E. U.U.	Arizona

G40149	México	Sonora	PI 477036	E.E. U.U.	Arizona
G40150	México	Sonora	PI 477038	E.E. U.U.	Arizona
G40151	México	Sonora	PI 440795	México	Sonora
G40152	México	Sonora	PI 527335	E.E. U.U.	Arizona
G40153	México	Sonora	PI 535224	E.E. U.U.	Puerto Rico
G40154	México	Sonora	PI 535227	E.E. U.U.	Puerto Rico
G40156	México	Sonora	PI 535233	E.E. U.U.	Puerto Rico
G40157	México	Sonora	PI 549447	México	-
G40158A	México	Sonora	PI 638833	México	-
G40159	México	Sonora	PI 653254	E.E. U.U.	N. México
G40160	México	Sonora	PI 638925	E.E. U.U.	Washington
G40161	México	Sonora	PI 638926	E.E. U.U.	Washington
G40162	México	Sonora	W6 32480	E.E. U.U.	Nebraska
G40163	México	Sonora	W6 32481	E.E. U.U.	Nebraska
G40164	México	Sonora	W6 32483	E.E. U.U.	Nebraska
G40165	México	Sonora	W6 32485	E.E. U.U.	Nebraska
G40166	México	Sonora			

IV.3-Evaluación de poblaciones interespecíficas por su nodulación con cepas de *Bradyrhizobium*

Líneas avanzadas de dos fuentes de poblaciones interespecíficas: INB (68 líneas con los padres recurrentes mesoamericanos desarrolladas en CIAT) y líneas de la Universidad de Saskatchewan (60 líneas con el padre recurente andino, NY5-161), y sus respectivos padres, fueron evaluados con una mezcla de las cepas USDA 110 y USDA 3254 de *Bradyrhizobium.* Para esto, se sembró las líneas en los bancos con arena y con las técnicas de inoculación descritas para los experimentos anteriores.

Se aportó a las plantas solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dilworth, 1970; Somasegaran y Hoben, 1994) y se controló las plagas y enfermedades de la forma requerida. A la

floración (aproximadamente 30 días después de siembra), se extrajo las raíces de las plantas para la evaluación de la nodulación, por su cantidad (número de nódulos), peso (mg) y tamaño. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA y la prueba de DMS ($P < 0.05$) con el programa Infostat®.

Se selecciónó aleatoriamente nódulos para analizar la correspondencia entre la cepa establecida con la cepa inoculada, a través de las secuencias del gen *rec*A. Adicionalmente, se tomó un nódulo de cada planta infectada, se desinfectó y colocó en medio YMA + Azul de Bromotimol a una concentración de 0.0025 (v/v) para observar la velocidad del crecimiento y la correspondencia con los géneros *Rhizobium*/*Bradyrhizobium* por los cambios de coloración en el medio, tomando en cuenta que las bacterias de *Rhizobium* acidifican el medio y lo tornan amarillo y las cepas de *Bradyrhizobium* lo alcalinizan tornándolo azul.

Para estas líneas se evaluó la presencia de los marcadores SCAR, SR2 (gen recesivo *bgm 1*), SW12 (QTL mayor de resistencia al BYGMV), SW13 (gen *I*- BCMV), PveIF4E^2 (*bc-3*, BCMV), SAP6 (QTL-CBB), SU91 (QTL-CBB). Para dichas evaluaciones se desinfectó 4 semillas de cada línea por 30 segundos con etanol 70% (v/v), hipoclorito de sodio 5% (v/v) y 3 lavados con agua destilada. Se secaron y pusieron a germinar en recipientes plásticos con papel húmedo cubiertos con papel aluminio durante 72 horas. De cada línea se cortó tejido de la hoja primaria de aproximadamente 2 mm^2 usando una pinza de punta fina y desinfectándola entre cada muestra con etanol 70% (v/v). Se siguió un protocolo de extracción rápida de ADN, colocando el tejido en platos, donde se agregó 40 µl de 0.25M NaOH a cada muestra. Se cubrió con una lámina de silicón estéril y se colocó en un plato térmico (Digital Head Block, Benchmark, Edison, NJ, E.E. U.U.) precalentado previamente a 95ºC durante 2 minutos. Se removió la lámina de silicón y se agregó

60 µl de 0.5M Tris-HCl (pH 8.0) a cada muestra. Se colocaron nuevamente en el plato térmico durante 2 minutos y después en hielo para su uso en PCR.

Para cada una de las reacciones de PCR se utilizó una mezcla maestra estandar con 13.5 µl de H_2O grado HPLC, 5 µl 5× Gotaq® Flexi Buffer, 2.5 µl 25mM $MgCl_2$, 0.5 µl 2 mM dNTP's, 0.5 µl iniciador F, 0.5 µl iniciador R, 0.5 µl GoTaq® ADN polimeresa y 2 µl ADN. Para el marcador SR2 se utilizó un protocolo de PCR de 34 ciclos (10s a 94ºC, 40s a 60ºC, 120s a 72 ºC), 5 min 72ºC, para el marcador SW12 se usó 30 ciclos (30s a 94ºC, 30s a 70ºC, 60s a 72 ºC), 5 min 72ºC, para el marcador SW13 fueron, 34 ciclos (10s a 94ºC, 40s a 67ºC, 120s a 72 ºC), 5 min 72ºC. Para el marcador SU91 se utilizó, 34 ciclos (10s a 94ºC, 40s a 58ºC, 120s a 72 ºC), 5 min 72ºC, para el marcador SAP6 se usó 34 ciclos (10s a 94ºC, 40s a 55ºC, 120s a 72 ºC), 5 min 72ºC y para el marcador PveIF4E[2] fueron 40 ciclos (20s a 94ºC, 20s a 59ºC, 20s a 72 ºC). Para la restricción enzimática de este marcador se utilizó 7 µl de H_2O grado HPLC, 4 µl de producto de PCR, 1 µl 10× Thermo Scientific Tango Buffer®, 0.5 µl enzima RsaI Thermo Scientific®, y se colocó a 37 ºC durante 3 horas. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Techne TC-412, Keison, Londres, Inglaterra). La amplificación de las bandas fue visualizada en geles de agarosa al 1% (p/v) + tinte SYBR Safe DNA (0.05% p/v) (Invitrogen by *life* Technologies, Carlsbad, CA, E.E. U.U.).

IV.4-Evaluación de nodulación de aislados de Puerto Rico en frijol tépari

Para obtener aislados de Puerto Rico, se recolectó suelo de la Subestación Experimental Agrícola de Corozal (18°19'58.87" N, 66°18'36.2" O), La subestación Experimental Agrícola Juana Díaz (18°01'11.18" N, 66°28'46.77" O) y la subestación Experimental Agrícola Isabela (18°27'47.68" N, 67°03'04.40" O). Sub-muestras de suelo de las 3 localidades se colocaron en maceteros y se

sembró una mezcla de semillas de diferentes genotipos de tépari. No se aplicó ningún tipo de fertilizante, se mantuvo el suelo húmedo según lo requirió y a la floración, se extrajo las raíces de las plantas y se lavaron cuidadosamente para observar la posible formación de nódulos.

Los nódulos formados se desinfectaron en el laboratorio con etanol 70% (v/v) durante 30 segundos, hipoclorito de sodio 5% (v/v) durante 2 minutos y 3 lavados con agua doblemente destilada, se maceraron y sembraron en medio YMA. Se purificaron las colonias crecidas con el método de estriado y Rojo Congo a una concentración de 0.005 (v/v) durante los siguientes 14 días, hasta obtener cultivos puros (Somasegaran y Hoben, 1994).

En conjunto con los demás aislados (Tabla 4), se evaluaron los aislados de Puerto Rico por sus características morfológicas, creciendo colonias de cultivos puros en medio YMA, YMA + CR (Rojo Congo), YMA + BB (Azul de Bromotimol) (Apéndice 1). De cada aislado se cultivó platos con los diferentes tipos de medio, con el método de estriado y cuando se observó el crecimiento de colonias individuales se midió la forma (cónica, plana, abovedada), color (blanco, blanco opaco, traslúcido, aparición de estructuras rojas con la edad), textura y apariencia (densidad, gomosidad, firmeza y brillo), diámetro promedio de la colonia (mm), reacción a CR en la oscuridad (absorbancia, no absorbancia, coloración rosada), reacción a BB (acidez o alcalinidad).

Para evaluar el desempeño de estas cepas con el frijol tépari, se estableció un ensayo en la Subestación Experimental Agrícola de Juana Díaz en un sistema de bancos con arena. Para esto, se seleccionaron los genotipos G40001, G40022A, G40029, G40041, G40060, G40066A, G40111, G40173 y la línea del programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS 12SH-9806-1. Se seleccionó una cepa de cada localidad y se utilizó como control la cepa USDA 3254. Se escarificaron mecánicamente todas las semillas y se sembraron directamente en la arena, las cuales

se inocularon a los 7 días después de la siembra en la base del tallo con inoculante líquido de cada cepa, crecidos en medio líquido YMA en agitación constante durante 72 horas y estandarizado a una concentración uniforme de 10^6 células/ ml. Cada cepa se distribuyó en 4 bancos diferentes para evitar contaminación entre las 4 cepas.

Las raíces de las plantas se extrajeron con una pala manual a los 21 días después de la inoculación y se lavaron para el análisis de los nódulos. Se evaluó el número de nódulos, el peso fresco (mg), el (diámetro mm) y la distancia entre la corona y el primer nódulos formado (cm). De cada genotipo se analizaron 4 plantas con cada una de las cepas. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA y la prueba de DMS ($P < 0.05$) con el programa Infostat®.

IV.5-Evaluación de líneas superiores de tépari e interespecíficas en condiciones de campo.

Las líneas de tépari que resultaron superiores en las evaluaciones, en conjunto con las líneas superiores de ambas poblaciones interespecíficas, fueron evaluadas en un experimento en el campo en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela. El experimento se estableció en una parcela con un pH de 5.1 y un contenido de materia orgánica del 2.38% (Apéndice 2). De las líneas evaluadas de CIAT y las dos poblaciones interespecíficas INB y SK, con cepas de *Bradyrhizobium,* se tomaron líneas con los valores superiores e inferiores en el número de nódulos y peso de nódulos (mg). De las líneas INB se evaluaron las líneas INB 809, INB 817, INB 826, INB 829, INB 835, INB 846, INB 848, INB 873 y algunos de los parentales: 'ICA Pijao' y G40001. De la población SK se evaluaron las líneas A-5-6, A-5-10, B-11-8, D-6-12, E-10-3, y los parentales de tépari: SK tepary gray, SK tepary gold. Las líneas contrastantes de la colección de CIAT incluyeron G40025, G40028, G40037A, G40144, G40165 y G40177E; y los cultivares de frijol común con habilidad de FBN conocida: 'Verano', TARS-LFR1 e IBC 301-204.

La siembra se realizó en noviembre de 2014 de forma manual, colocando la semilla previamente inoculada en el fondo del surco y tapando de inmediato. La inoculación se hizo con inoculante sólido a base de turba (American Peat Technology, LLC, MN, E.E. U.U.). Para la inoculación se colocaron las semillas en platos petri individuales con el inoculante de la cepa USDA 3254 y USDA 110, los cuales fueron crecidos individualmente en medio YMB (con la misma metodología de los experimentos anteriores) y cuando alcanzaron 10^6 células/ ml, se mezclaron en partes iguales con turba previamente esterilizada, a razón de 1 litro de inóculo para cada kilogramo de turba. Las semillas se inocularon adicionando 3 gramos de inoculante a la semilla previamente humedecida con agua estéril. Las semillas inoculadas se mantuvieron en refrigeración a 6℃ durante la noche hasta el momento de la siembra, para evitar una disminución del rizobio. Inmediatamente después de la siembra se realizó un riego para garantizar la humedad del suelo y mantener la viabilidad del inóculo. No se realizó fertilización química al suelo para evitar el aporte de nitrógeno que pudiera impedir la nodulación.

A los 12 días después de siembra, se realizó una segunda inoculación con inoculante líquido constituido por las mismas dos cepas, multiplicadas en YMB y diluido con agua estéril a la concentración de 10^7 células/ml, previniendo la posible disminución de células debido a condiciones desfavorables para el rhizobio. Se aplicó el inoculante líquido en el área alrededor de la base del tallo de las plantas aproximadamente 2 ml de inóculo/planta, en las horas frescas de la tarde, para garantizar un ambiente adecuado para la infección.

A los 40 días después de la siembra, se evaluaron las características de nodulación, tomando en cuenta el número de nódulos, la ubicación de los mismos y el color. Se contó el número total de nódulos, se utilizó una escala de 1-3 para la ubicación, siendo 3= en la corona, 2= lateral y menos cerca de la corona, 1= en las raíces más lejanas a la corona. Para el color se utilizó igualmente una

escala de 1-3, siendo 3= nódulos rosados, 2=nódulos predominantemente rosados pero con algunos verdes o amarillos, 1=nódulos verdes o amarillos. Se tomó una valoración agronómica general del aspecto de la planta en una escala de 1-5, siendo 5= plantas verdes y vigorosas, 3= plantas verdes pero relativamente pequeñas, 1= plantas cloróticas, pequeñas y sin vigor. La valoración agronómica se tomó considerando el vigor y crecimiento típico de ambas especies.

El experimento consistió en un total de 3 bloques con inoculación. En cada bloque se ordenó un surco de 1 m de cada genotipo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y la prueba de DMS ($P < 0.05$) con el programa Infostat®.

IV.6-Secuenciación de genes *nod*C, *rec*A y *atp*D

Cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Tabla 4) utilizadas para la evaluación de germoplasma, incluyendo cepas provenientes de la colección de USDA, CIAT, Programa de Investigaciones de Frijol (PIF) Honduras y aislados de Puerto Rico, fueron crecidos en tubos estériles conteniendo 5 ml de YMB, durante 72 horas y con agitación constante.

El ADN de las cepas fue purificado con el kit para purificación de microbios UltraClean® (MO BIO Laboratories, Inc.). Se cuantificó con un fluorómetro (Quantus, Promega, San Luis Obispo, CA, E.E. U.U.) y la calidad fue verificada con un gel de agarosa al 1% (p/v) + tinte SYBR Safe DNA (0.05% p/v) (Invitrogen by *life* Technologies, Carlsbad, CA, E.E. U.U.).

Un total de 17 iniciadores fueron utilizados en 13 combinaciones diferentes usando diferentes perfiles en PCR (Tabla 5). Para la mezcla maestra de las diferentes reacciones de PCR se utilizó 13.5 µl de H_2O grado HPLC, 5 µl 5× Gotaq® Flexi Buffer, 2.5 µl 25mM $MgCl_2$, 0.5 µl 2 mM dNTP's, 0.5 µl iniciador F, 0.5 µl iniciador R, 0.5 µl GoTaq® ADN polimeresa y 2 µl ADN a una

concentración estandarizada de 30 µg/µl. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (C1000 Touch, BIO-RAD, CA, E.E. U.U.).

Tabla 4. Género, especie, y fuente de las cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* utilizadas en los experimentos en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Cepa	Género	Especie	Otros códigos	Referencia o fuente
USDA 110[3]	*Bradyrhizobium*	*diazoefficiens*	TAL 102, SEMIA 5032	Delamuta *et al*. 2013
USDA 94	*Bradyrhizobium*	*elkanii*	JCM 10832	Van Berkum *et al*. 2012
USDA 3254	*Bradyrhizobium*	*elkanii*		Van Berkum *et al*. 2012
USDA 76	*Bradyrhizobium*	*elkanii*	JCM 20931, IAM 13629	Delamuta *et al*. 2013
USDA 73	*Bradyrhizobium*	*japonicum*		Van Berkum *et al*. 2012
USDA 122	*Bradyrhizobium*	*japonicum*	IITA2126, BCRC 13533	Van Berkum *et al*. 2012
USDA 123	*Bradyrhizobium*	*japonicum*	NIFTAL 376, BCRC 13529	Van Berkum *et al*. 2012
USDA 3	*Bradyrhizobium*	*japonicum*		Van Berkum *et al*. 2012
EAPBAN	*Bradyrhizobium*	spp.		PIF
EAP 1001	*Bradyrhizobium*	spp.		PIF
CIAT 632	*Rhizobium*	*etli*	TAL 1383	CIAT
CIAT 899	*Rhizobium*	*tropici*	USDA 9030, UMR 1899, TAL 1797	Ormeño-Orillo *et al*. 2012
CR 477	*Rhizobium*	*tropici*		PIF
UPR 2010	*Bradyrhizobium*	spp.		C. Estevez de Jensen
Corozal	*Bradyrhizobium*	spp.		A.G. Vargas, 2014
Juana Díaz	*Bradyrhizobium*	spp.		A.G. Vargas, 2014
Isabela	*Bradyrhizobium*	spp.		A.G. Vargas, 2014

[3] USDA= cepas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-Agricultural Research Service National *Rhizobium* Resource Collection), PIF= Programa de Investigaciones en Frijol de Zamorano, CIAT= Centro Internacional de Agricultura Tropical

Los productos fueron purificados directamente del producto de PCR, en los casos donde una banda individual fue visualizada usando el kit para purificación de PCR (Qiagen, Valencia, CA, E.E. U.U.). Cuando se obtuvo productos con bandas múltiples, la banda deseada fue cortada del gel de agarosa con una cuchilla estéril, purificándose con el kit comercial MiniElute Gel Extraction Kit© (Qiagen, Valencia, CA, E.E. U.U.). Los productos purificados fueron estandarizados a una concentración de 30 ng/µl, y fueron enviados para ser secuenciados (SeqWright Genomic Services, Houston, TX, E.E. U.U.). Las secuencias fueron alineadas con el programa Sequencher® y el análisis filogenético fue completado con el método "Neighbour-Joining tree" con 1000 remuestreos usando MEGA 6®.

Tabla 5. Iniciadores y programas de PCR utilizados en la secuenciación de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Iniciadores	5'-3' secuencia de nucleótido	Perfil térmico de PCR	Referencia
nodCF	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
nodCFu	AYGTHGTYGAYGACGGITC	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
nodCF2	AYGTHGTYGAYGACGGCTC	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
nodCF4	AYGTHGTYGAYGACGGATC	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
nodCFn	AGGTGGTYGAYGACGGTTC	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	3 min 95 ˚C, 35 × (1min 94 ˚C, 1 min 55 ˚C, 2 min 72 ˚C), 3 min 72 ˚C	Laguerre *et al.* 2001
recA-fw1	CGKCTSGTCGAGGAYAAATCGGTGGA	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
recA-fw2	ATCGAGCGGTCGTTCGGCAAGGG	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
recA-rv1	TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
recA-rv2	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
TSrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	2 min 95 ˚C, 35 × (45 s 95 ˚C, 30 s 58 ˚C, 1.5 min 72 ˚C), 7 min 72 ˚C	Stepkowski *et al*. 2005
TSrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG	2 min 95 ˚C, 35 × (45 s 95 ˚C, 30 s 58 ˚C, 1.5 min 72 ˚C), 7 min 72 ˚C	Stepkowski *et al*. 2005
TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	2 min 95 ˚C, 35 × (45 s 95 ˚C, 30 s 58 ˚C, 1.5 min 72 ˚C), 7 min 72 ˚C	Stepkowski *et al*. 2005
TSATPDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG	2 min 95 ˚C, 35 × (45 s 95 ˚C, 30 s 58 ˚C, 1.5 min 72 ˚C), 7 min 72 ˚C	Stepkowski *et al*. 2005
atpD-fw1	SCTGGGSCGYATCMTGAACGT	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
atpD-fw2	ATCGGCGAGCCGGTCGACGA	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001
atpD-rv1	GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG	5 min 95 ˚C, 30 × (45 s 94 ˚C, 1 min 50 ˚C, 1.5 min 74 ˚C), 3 min 72 ˚C	Gaunt *et al*. 2001

IV.7-Desarrollo de una población interespecífica para la introgresión de mayor eficiencia de FBN en el frijol común

Aproximadamente 10 genotipos de tépari fueron seleccionados basado en los resultados de los experimentos preliminares por tener una capacidad superior de FBN (basado en número y peso de nódulos). Estos genotipos fueron dispuestos en un bloque de cruzamiento con 6 genotipos parentales de *Phaseolus vulgaris*: ' ICA Pijao ', ' Verano ', ' Seda Criollo ', IBC 301-204 y TARS-LFR1. Las semillas fueron sembradas en maceteros conteniendo medio para plantas (Sunshine Mix #1, Sun Gro Horticulture, AB, Canadá). Ambos parentales (*P. acutifolius* y *P. vulgaris*) fueron sembrados simultáneamente para evaluar las características de las hojas, tamaño de las brácteas y hábito de crecimiento. Los embriones de la semilla F_1 fueron rescatados 2-3 semanas después de la polinización a través de cultivo *in vitro* (Ferwerda *et al*., 2003) en un medio conteniendo 10 mM KCl, 1.5 mM K_2SO_4, 20 g sucrosa, 100 mg myo- inositol, 10 mg tiamina, 1 mg ácido nicotínico, 1 mg piridoxina - HCl, 3 mg glicina, 40 mM glutamina, 20 mM asparagina, 1 g de caseína y 100 ml de agua de coco por litro. El medio fue autoclavado a 121˚C and 15 psi en frascos Magenta®. El agua de coco fue agregada después de la esterilización, filtrada en frascos al vacío (Corning, Corning, NY, E.E. U.U.). Los embriones fueron esterilizados con etanol 95% (v/v) durante 30 segundos, hipoclorito de sodio 5% (v/v) por 10 minutos y lavados con agua doblemente destilada 3 veces. Una vez los embriones estuvieron estériles, fueron colocados en papel filtro estéril para secarse, durante 30 minutos y sembrados, todo bajo cámara de flujo laminar. Los embriones plantados *in vitro* fueron incubados durante 1-3 semanas a 26 °C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, dependiendo del crecimiento de las estructuras primarias. Los embriones bien desarrollados fueron aclimatados en maceteros de 3” con medio estéril, dentro del laboratorio con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se intentó retrocruzar las plantas F_1 hacia ambas especies y se utilizó algunas de las flores de las plantas F_1 como el parental materno, siendo que se observó poco polen en las flores formadas.

IV.8-Resistencia a BCMV y BCMNV

Las 315 accesiones del panel de diversidad de tépari (TDP) que incluyen líneas de la colección de CIAT, colección de USDA y líneas mejoradas del programa USDA-ARS-TARS (Apéndice 3), fueron evaluadas por su reacción a BCMNV, en un invernadero en el Recinto de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez y las facilidades de USDA-ARS-TARS. Las semillas fueron escarificadas mecánicamente y sembradas en maceteros individuales de 2" con medio (Sunshine Mix #1, Sun Gro Horticulture, AB, Canadá). Una semana después de emerger, la superficie del haz de las hojas primarias fue inoculada. El inóculo de la cepa NL 3 D fue preparado usando hojas infectadas de la línea susceptible PR 0443-151, en un buffer de 0.05M de fosfato, conteniendo 117 ml de 0.2 M monobásico (13.9 g fosfato de sodio monobásico + 500 ml de agua) + 183 ml 0.2 M dibásico (53.65 g fosfato de sodio dibásico heptahidratado + 1 L agua), pH 7 (aprox. 1:10 w/v) (Morales, 1989), usando palillos con algodón para distribuir el inóculo y carborundo para facilitar la penetración e infección del virus. Se utilizó como control el cultivar 'Verano', que tiene el gen *I* y muestra necrosis cuando es inoculado, a manera de poder observar el éxito en la infección. Las accesiones con una repuesta necrótica en las hojas primarias, fueron evaluadas en dos experimentos adicionales para confirmar su respuesta.

Una segunda infección fue llevada a cabo para confirmar la reacción fenotípica y detectar la presencia/ausencia del virus, usando el kit comercial monoclonal de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), que detecta todas las cepas de BCMV/BCMNV. (PhatoScreen® BCMV Agdia, Elkhart, IN, E.E. U.U.) para confirmar los síntomas fenotípicos. La misma fuente de inóculo y procedimiento de elaboración fueron utilizados. Se utilizó una planta de 'Verano' por cada 13 plantas evaluadas para asegurar que se infectaron todas las plantas inoculadas. De forma consistente, se tomó como muestra la hoja central del primer trifolio verdadero a los 15 días después de la infección, se siguió el protocolo sugerido por la compañía para el kit utilizado y las

lecturas fueron tomadas con un espectrofotómetro (Ultramark, Bio Rad, Philadelphia, PA, E.E. U.U.) con el software Microplate Manager 5.2.1 (BIO RAD, CA, E.E. U.U.). Se estableció los valores negativos basado en el control negativo utilizado en cada prueba (tejido de planta no infectado), considerándose negativos todos los genotipos que tuvieron en la lectura un valor 2× el control negativo o menos (Gillett, *et al*., 1986). Dichos genotipos se sembraron en un nuevo experimento, utilizando 10 plantas de cada genotipo y las mismas técnicas de producción de inóculo, inoculación y prueba de ELISA, para verificar su reacción.

Todas las características fenotípicas fueron evaluadas desde los 7 días después de la inoculación y confirmadas en evaluaciones en las siguientes 2 semanas. Se evaluó la reacción en el área inoculada y en el resto de la planta, tomando como referencia los síntomas de reacción a esta cepa en frijol común (Kelly, 1997). En el área inoculada (ambas hojas primarias), se evaluó la presencia o ausencia de síntomas (NS). Cuando hubo presencia de necrosis, se observó si ésta fue restringida en el área de las venas (VN) u otras lesiones en el resto de lámina foliar (NLL). En el resto de los trifolios, se observó la presencia de síntomas de mosaico (M), y se clasificó como mosaico severo (sM) cuando se observó máxima expresión de síntomas y como mosaico leve (mM) cuando solo se observó una leve distorsión de las hojas, tomándose en cuenta también cuando el mosaico provocó enrollamiento de las hojas (Lc). La expresión ascendente de cualquier tipo de necrosis hacia los trifolios de la planta se consideró como necrosis sistémica (SN). Se observó también cuando la necrosis provocó la muerte de la planta en los 7 días después de la inoculación (sD) o cuando ésta sucedió después de los 7 días (dD).

V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1-Selección de cepas de *Bradyrhizobium*

Un total de siete cepas de *Bradyrhizobium* fueron evaluadas con diferentes genotipos de frijol tépari, obteniéndose diferencias entre el promedio de las cepas para las variables de número de nódulos y peso fresco de nódulos (Tabla 6). La cepa USDA 3254 tuvo los valores más altos con promedios de 1.05 nódulos, 25.76 mg por planta en los tépari, y 8 nódulos, 73.32 mg por planta incluyendo los controles. La cepa USDA 76 no fue diferente de ésta en el número de nódulos con 0.9 en promedio y 5.2 incluyendo los controles, pero si fue inferior en el peso con 13.14 mg. en los genotipos de tépari. La tercera cepa de la especie *Bradyrhizobium elkanii* USDA 94, fue inferior a USDA 3254 en ambos parámetros.

La cepa USDA 110 tuvo un desempeño similar a las cepas USDA 76 y USDA 94 en los resultados de los tépari, pero en los resultados con los controles tuvo valores similares a USDA 3254 en el número de nódulos. Las cepas USDA 122 y USDA 123 no fueron diferentes de la cepa USDA 110 en el número de nódulos pero si fueron inferiores en el peso. Cuando se tomaron en cuenta los controles no hubo ninguna diferencia entre USDA 110, USDA 122 y USDA 123. La cepa CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), fue inferior a todas las cepas evaluadas para ambos parámetros.

Hubo una variación entre los genotipos de tépari en la nodulación. Un total de 15 formaron nódulos con la cepa USDA 3254, 11 con la cepa USDA 76, nueve con las cepas USDA 94, USDA 122, USDA 123; ocho con la cepa USDA 110 y cuatro con la cepa CIAT 899. El genotipo G40022A tuvo la habilidad de nodular con todas las cepas.

En estudios conducidos en el área sureste de Kenia con frijol tépari, para evaluar su capacidad de FBN bajo condiciones de invernadero, la cepa USDA 3254 mostró ser superior a otras 4 cepas en número de nódulos, peso seco de nódulos, peso seco de raíz y peso seco del follaje, igualando al control fertilizado con nitrógeno en las variables de peso seco de raíz y follaje, cuando se utilizó como fuente nitrato de calcio de amonio (26% N) a razón de 40 kg/ha (Shisanya, 2003). Estos resultados coinciden también por los encontrados en condiciones de campo, cuando se inocularon 3 líneas diferentes de frijol tépari y de un total de 15 cepas de *Bradyrhizobium* evaluadas, la cepa USDA 3254 fue una de las tres superiores, en conjunto con otras dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* UMR 3007 y UMR 3043 (Mohrmann, 2011).

Adicionalmente, de las cepas evaluadas, USDA 3254 fue la única aislada de *Phaseolus acutifolius*, en Arizona, Estados Unidos. En el frijol común, la especificidad genotipo × cepa es de suma importancia, ya que ha sido demostrado la preferencia de los genotipos a nodular con cepas correspondientes a sus centros de origen (Oliveira *et al*., 2010).

En el caso de la soya en Brasil, los mayores progresos en la FBN se hicieron después del año 1992, cuando se contó con clasificaciones más específicas de las especies que nodulan el cultivo de forma eficiente (Kuykendall *et al*., 1992). Anteriormente las dos cepas que se estaban usando como inoculantes 29W y SEMIA 587, fueron cepas de *Bradyrhizobium elkanni*, las cuales son altamente competitivas pero no tienen la misma eficiencia que *Bradyrhizobium japonicum* en su relación con la soya (Nishi *et al*., 1996).

La cepa USDA 110 ha sido utilizada por diferentes países en la fabricación de inoculantes, especialmente para el cultivo de soya (Delamuta *et al*., 2013) y su aporte en el incremento de rendimiento por área ha sido demostrado.

Aunque solamente se evaluó una cepa de *Rhizobium* (CIAT 899), los resultados obtenidos sugieren que se obtiene una nodulación superior en tépari, cuando establece relaciones con bacterias del género *Bradyrhizobium*, sin embargo este estudio no muestra datos de relaciones con otras cepas eficientes de otras especies como *Rhizobium etli.*

En el frijol caupí (*Vigna unguiculata*), aunque se conoce que tiene mayor nodulación con cepas de *Rhizobium*, se ha encontrado que nodula efectivamente con cepas de *Bradyrhizobium* que potencialmente podrían utilizarse como inoculante para este cultivo (Cuadrado *et al*., 2009), por esta razón se intentó observar de forma separada en este experimento las cepas incluyendo y excluyendo los controles de caupí.

Tabla 6. Número de nódulos y peso freso de nódulos de 20 genotipos de tépari evaluados en la selección de cepas de *Bradyrhizobium* y peso de 100 semillas (g) en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Genotipo	Peso 100 semillas (g)	USDA 3254		USDA94		USDA 76		USDA 110		USDA 122		USDA 123		CIAT 899	
		NN[ɤ]	PFN (mg)	NN	PFN (mg)	NN	PFN (mg)	NN	PFN (mg)	NN	PFN (mg)	NN	PFN (mg)	NN	PFN (mg)
G40122	17.8	1	68	1	22	1	16	1	30	1	28	1	29	0	0
G40022A	16.2	1	96	1	68	2	89	1	55	1	49	1	28	1	14
G40232	15.9	3	47	0	0	0	0	1	43	1	36	1	42	0	0
G40010	14.5	1	24	0	0	2	22	0	0	0	0	0	0	0	0
G40128	13.7	1	7	1	11	2	9	1	12	1	6	2	11	0	0
G40036	12.0	0	0	2	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G40301	10.9	1	15	0	0	2	15	0	0	0	0	0	0	0	0
G40035	10.5	2	93	1	55	0	0	1	46	1	45	1	30	0	0
G40177D	9.0	2	85	0	0	3	41	0	0	0	0	0	0	0	0
G40107	5.2	1	10	1	45	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12
G40177E3	4.8	0	0	0	0	0	0	3	18	2	18	2	12	0	0
G40198	4.3	2	10	0	0	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0
G40087	4.2	3	31	0	0	2	13	0	0	0	0	0	0	0	0
G40295	4.1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G40235	3.2	1	37	0	0	0	0	2	11	2	14	1	9	0	0
G40179	2.8	0	0	2	32	1	27	0	0	0	0	0	0	0	0
G40258	2.8	1	20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	1	14
G40222	2.5	0	0	1	21	1	19	0	0	1	15	0	0	1	14
G40078	1.9	1	16	0	0	0	0	2	28	0	0	0	0	0	0
G40207	1.7	0	0	1	16	1	13	0	0	1	10	1	26	0	0
		1.05	26.76	0.57	14.38	0.9	13.14	0.62	12.29	0.57	11.19	0.57	26.28	0.19	2.57
DMS (P≤0.05)= 0.477 (N), 9.324 (PF)[φ]			15[∞]		9		11		8		9		9		4
TARS-Tep 22	11.5	0	0	0	0	0	0	1	15	1	14	1	9	0	0
524B	18.0	56	226	0	0	46	213	20	165	16	120	14	92	15	47
Apagbaola IFE	11.0	39	308	36	306	29	198	35	250	31	233	0	0	6	36
Brown	11.0	31	287	39	206	13	78	0	0	0	0	28	199	1	14
Mouride	14.0	52	450	35	310	23	236	29	189	27	174	31	162	0	0
		8.00	73.32	4.8	44.12	5.2	40.04	3.88	34.48	3.44	30.48	3.4	9.72	1.04	6.04
DMS (P≤0.05)= 3.695, 25.721[Θ]			4[£]		3		4		4		4		4		3

[ɤ] NN=número de nódulos, PFN= peso fresco de nódulos (mg), [φ]= valores de la DMS para número de nódulos (N) y peso fresco de nódulos (PF) de loa genotipos de tépari, [∞]= número de genotipos de tépari que noduló con cada cepa. [Θ]valores de la DMS para cada cepa incluyendo los controles, [£] número de genotipos total que noduló con cada cepa.

V.2-Selección de genotipos de frijol tépari

Tomando en consideración estos aspectos, es importante definir en el frijol tépari su amplitud o preferencia para nodular con los grupos de cepas establecidas, por lo cual, se realizó tanto una evaluación de un grupo que incluyera formas de plantas cultivadas y silvestres con dos especies de *Bradyrhizobium*, y una segunda evaluación con genotipos cultivados, que fueron los que presentaron mayor nodulación general, en interacción con una sola cepa.

Del total de 207 genotipos evaluados con inoculación de 2 cepas, 157 presentaron nodulación, de los cuales, 32 genotipos fueron formas silvestres, 5 semi-domesticados y 120 correspondieron a genotipos cultivados (incluyendo las líneas mejoradas del programa de USDA-ARS-TARS). Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos (Tabla 7) para el número el peso fresco de nódulos (mg).

Tabla 7. Número de nódulos y peso (g) de líneas de tépari de la colección de CIAT y del programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS inoculadas con las cepas USDA 110 + USDA 3254 de Bra*dyrhizobium* evaluado 21 días después de la inoculación en Mayagüez, PR. 2014.

Identificación	País	Peso 100 semilas (g)	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Peso promedio de nódulo (mg)
G40028	EE. UU.	14.8	16.0	133	8
G40111	México	13.3	8.7	53	6
G40271	México	19	6.7	140	21
G40201	Costa Rica	13.9	6.7	53	8
G40144A	México	15.2	4.7	30	6
G40022	EE. UU.	15.3	4.3	50	12
G40146	México	14.4	4.3	73	17
G40037A	EE. UU.	17.5	4.0	27	7
G40200	Costa Rica	14.5	4.0	20	5
G40127	México	13.9	3.3	7	2
G40237A	México	16	3.3	27	8
G40142A	México	15.2	3.3	40	12
G40147	México	14.6	3.0	43	14
G40237	México	17.1	3.0	30	10

G40025	EE. UU.	18.4	3.0	43	14
9811-1	Puerto Rico[£]	10.3	2.7	87	33
G40202	México	2.9	2.7	63	24
G40120	México	15.8	2.7	13	5
G40206	México	4.4	2.3	7	3
G40060	-	13.8	2.3	63	27
G40043	Nicaragua	15.4	2.3	30	13
9808-1	Puerto Rico	13.6	2.3	53	23
G40020	México	13.9	2.3	47	20
G40012	Nicaragua	14.2	2.0	33	17
G40141	México	13.5	2.0	3	2
G40144B	México	16.3	2.0	130	65
G40018	México	14.7	2.0	30	15
9805-1	Puerto Rico	17.3	2.0	43	22
G40130	México	12.6	2.0	50	25
G40040	EE. UU.	17.4	2.0	20	10
G40035	México	10.5	2.0	17	8
G40282	EE. UU.	18.2	2.0	17	8
G40128	México	13.7	1.7	20	12
G40110	México	15	1.7	37	22
G40013D	Nicaragua	14.8	1.7	27	16
9800-2	Puerto Rico	11.5	1.7	17	10
G40276	México	14.4	1.7	30	18
G40001	México	16.1	1.7	13	8
G40289	México	3	1.7	30	18
G40034	México	14.9	1.7	23	14
G40173A	México	19.3	1.7	23	14
G40013A	Nicaragua	14.3	1.7	73	44
G40142A	México	16.8	1.3	20	15
G40112	México	16.1	1.3	23	18
G40279	México	15.2	1.3	180	135
G40170	México	1.4	1.3	20	15
G40181	EE. UU.	2.9	1.3	3	3
9812-1	Puerto Rico	17.3	1.3	3	3
G40165	México	14.5	1.3	137	103
G40008	Marruecos	16.8	1.3	20	15
G40177B1	EE. UU.	10.1	1.3	3	3
G40173C	México	16.1	1.3	27	20
G40138	México	13	1.3	10	8
G40144C	México	13.7	1.3	27	20

G40272	México	15.5	1.0	37	37
G40149	México	13.4	1.0	1	1
G40177C	EE. UU.	8	1.0	20	20
G40009	El Salvador	16	1.0	40	40
G40125	México	16.3	1.0	60	60
G40032	Guatemala	15.2	1.0	10	10
G40162	México	15.8	1.0	27	27
G40022A	EE. UU.	16.2	1.0	10	10
G40290	México	3.7	1.0	3	3
G40304	EE. UU.	17.2	1.0	7	7
G40284	EE. UU.	27.2	1.0	17	17
G40277	México	15.2	1.0	1	1
G40041	África del Sur	15.5	1.0	20	20
G40116	México	7.4	1.0	13	13
G40122	Zambia	17.8	1.0	1	1
G40021	México	13.8	1.0	27	27
G40177E1	EE. UU.	6	1.0	13	13
G40163	México	14.1	1.0	3	3
G40006B	México	15.2	1.0	13	13
G40160	México	16.4	1.0	13	13
G40238	México	16.2	1.0	13	13
G40177E	EE. UU.	6	1.0	40	40
G40010	El Salvador	14.5	1.0	7	7
4263	Puerto Rico		1.0	40	40
G40103	México	4	1.0	7	7
G40174	México	15.6	1.0	13	13
G40283	EE. UU.	16.2	1.0	30	30
G40151	México	14.3	1.0	7	7
G40058	El Salvador	12.7	1.0	7	7
G40234	EE. UU.	21.6	1.0	23	23
G40221	EE. UU.	2.2	1.0	1	1
4257	Puerto Rico		1.0	3	3
G40038	México	14.2	0.7	20	30
G40061	El Salvador	13.3	0.7	17	25
G40066A	EE. UU.	15.9	0.7	37	55
G40076	EE. UU.	2.9	0.7	1	2
G40039	México	13.7	0.7	0	0.5
G40177E2	EE. UU.	12.5	0.7	17	25
G40175	EE. UU.	18.6	0.7	17	25
G40173	México	15	0.7	10	15
G40207	EE. UU.	1.7	0.7	13	20

G40228	EE. UU.	2.3	0.7	30	45
G40119	México	14.2	0.7	13	20
G40301	Zimbabwe	10.9	0.7	23	35
9809-1	Puerto Rico	11.1	0.7	50	75
G40148	México	16.4	0.7	20	30
G40199	México	4.4	0.7	10	15
G40303	Nicaragua	13.9	0.7	10	15
4279	Puerto Rico		0.7	20	30
G40274	México	5.4	0.7	33	50
G40177A1	EE. UU.	10.5	0.7	20	30
9813-2	Puerto Rico	17.1	0.7	43	65
G40196	EE. UU.	4.3	0.7	3	5
G40177D	EE. UU.	9	0.7	3	5
G40232	México	15.9	0.7	7	10
G40275	México	15	0.7	10	15
G40095	México	3.6	0.7	7	10
G40294	México	4.6	0.7	10	15
G40302	Zimbabue	9.2	0.7	7	10
G40204	EE. UU.	2	0.3	10	30
G40248	México	2.2	0.3	3	10
G40037	EE. UU.	16.8	0.3	7	20
G40067	EE. UU.	17.6	0.3	100	300
G40144	México	13.2	0.3	43	130
G40192	México	6.2	0.3	17	50
G40177F	EE. UU.	9	0.3	7	20
G40194	México	6.4	0.3	1	3
G40213	EE. UU.	1.9	0.3	7	20
G40166	México	14.3	0.3	17	50
G40177A2	EE. UU.	9.8	0.3	7	20
G40233	EE. UU.	2.2	0.3	1	4
G40235	-	3.2	0.3	13	40
G40222	EE. UU.	2.5	0.3	7	20
G40269	México	15.5	0.3	0	1
G40261	México	1.9	0.3	1	4
G40023	EE. UU.	15.8	0.3	7	20
9800-1	Puerto Rico	14.2	0.3	3	10
G40299	Guatemala	12.6	0.3	3	10
G40296	México	6	0.3	3	10
9805-2	Puerto Rico	16.9	0.3	7	20
G40030	EE. UU.	18.2	0.3	1	4
G40036	México	12	0.3	10	30

9801-2	Puerto Rico	17.4	0.3	7	20
9801-1	Puerto Rico	16.9	0.3	27	80
9803-1	Puerto Rico	16.4	0.3	7	20
4288	Puerto Rico		0.3	7	20
G40057	-	16.9	0.3	33	100
9809-2	Puerto Rico	12.2	0.3	10	30
G40068	EE. UU.	18	0.3	1	2
G40087	México	4.2	0.3	10	30
G40105	México	3.8	0.3	2	5
G40150	México	13.6	0.3	17	50
G40145	México	13.8	0.3	20	60
G40073	México	4.2	0.3	3	10
G40083	México	4.3	0.3	7	20
G40152	México	15.1	0.3	10	30
G40117	EE. UU.	2.3	0.3	1	3
G40143	México	13.4	0.3	13	40
G40129	México	13.4	0.3	17	50
G40140	México	13.7	0.3	10	30
G40158A	México	16.8	0.3	2	5
G40157	México	15.5	0.3	17	50
G40156	México	17	0.3	7	20
DMS ($P \leq 0.05$)			1.8	34	

[£] las líneas de Puerto Rico corresponden al programa de mejoramiento de USDA-ARS-TARS; -información desconocida.

Lo genotipos G40028, G40146, G40271, presentaron la combinación de valores más altos para ambas variables, con valores de 16, 4.3 y 6.7 nódulos; con pesos frescos de 133, 73 y 140 mg por planta. Los genotipos G40022, G40111, G0144A, G40200, G40201, tuvieron valores igualmente altos en el número de nódulos, pero no en sus pesos. Los genotipos G40279 y G40144B, obtuvieron menos número de nódulos pero altos valores de peso fresco de 180 y 130 mg, con altos valores de peso individual de nódulos de 135 y 65 mg. Los genotipos G40279, G40165 presentaron alto peso individual de nódulos de 135 y 103 mg, aunque no fueron de los superiores en el grupo de acuerdo a su número y peso por planta.

Todos estos genotipos representan formas cultivadas con tipos de semilla entre 19 y 10 gramos/100 semillas y son provenientes de EE. UU., México y Costa Rica. El genotipo G40202 (2.9 gramos/100 semillas) tuvo 2.7 nódulos, con un peso fresco de nódulos de 63 mg, siendo el único silvestre que se presentó valores superiores similares a los genotipos cultivados con los valores más altos.

Estudios realizados con genotipos representativos de frijol común de ambos centros de origen, con cepas de *Rhizobium etli* (CIAT 632) y *Rhizobium tropici* (CIAT 899), mostraron mayor peso de la planta y mayor evaluación de nodulación en los tipos de semilla de mayor tamaño (Racancoj*, et al*., 2014).

Experimentos en invernadero, en medio estéril, con inoculación líquida de diferentes cepas de *Bradyrhizobium* y fertilización libre de nitrógeno, mostraron valores en el número de nódulos entre 3 y 40 nódulos por planta (Shisanya, 2003). La semilla utilizada en dicho experimento, fue proveniente del mercado de pequeños agricultores en Kiboko, Kenia, por lo cual no se puede hacer una comparación con genotipos específicos. Los valores obtenidos de la evaluación de las líneas de la colección de CIAT también pudieron ser inferiores, probablemente porque las condiciones en las que fue evaluado fueron bastante limitantes para la planta en el medio de arena y época del año.

Cuando se inoculó los genotipos cultivados con la cepa USDA 3254, identificada como superior en su habilidad de nodular frijol tépari, se encontraron diferencias significativas en los parámetros de número y peso de nódulos evaluados. En general, las medias del grupo de genotipos cultivados evaluado con una sola cepa fueron 11 nódulos y 44.9 mg por planta, superiores en comparación

con las medias del grupo de genotipos cultivados evaluados con las dos cepas (USDA 3254 + USDA 110), con valores de 1.4 nódulos y 24 mg por planta.

De los 151 genotipos cultivados inoculados, 138 presentaron nodulación (Tabla 8). Los 7 genotipos silvestres y las líneas TARS-Tep 23, TARS-Tep 29 y TARS-Tep 32, también presentaron nodulación.

Tabla 8. Número de nódulos, peso fresco y peso promedio de un nódulo (mg) de líneas cultivadas del panel de diversidad de tépari (TDP) inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 3254 evaluado 21 días después de la inoculación en Mayagüez, PR. 2014.

Genotipo	Número de nódulos			Peso fresco de nódulos (mg)			Peso promedio de nódulo (mg)		
	NT[β]	NAS	NAI	PF[ŋ]	PFAS	PFAI	PPN[ɡ]	PPAS	PPAI
G40142A	52.25	32.00	20.25	52.28	27.95	24.33	1.00	0.87	1.20
G40141	36.75	18.75	18.00	12.63	6.78	5.85	0.34	0.36	0.33
G40237A	23.75	14.75	9.00	87.25	67.75	19.50	3.67	4.59	2.17
G40161	25.75	14.75	11.00	138.68	89.70	48.98	5.74	6.69	4.45
PI 476858	38.50	14.25	24.25	67.88	36.03	31.85	1.76	2.53	1.31
PI 440802	19.75	14.25	5.50	34.00	24.00	10.00	1.72	1.68	1.82
PI 549447	31.50	14.25	17.25	40.38	28.05	12.33	1.28	1.97	0.71
PI 535224	27.00	13.75	13.25	136.23	84.28	51.95	5.05	6.13	3.92
Neb T-15-s	29.00	13.50	15.50	179.83	89.95	89.88	6.20	6.66	5.80
G40283	15.75	13.25	2.50	29.25	25.25	4.00	1.86	1.91	1.60
G40144B	20.50	13.25	7.25	94.38	58.50	35.88	4.60	4.42	4.95
G40269	15.50	13.00	2.50	38.25	34.50	3.75	2.47	2.65	1.50
G40175	21.50	13.00	8.50	82.28	53.75	28.53	3.83	4.13	3.36
G40143	22.75	12.75	10.00	93.68	51.03	42.65	4.12	4.00	4.27
PI 653254	26.25	12.25	14.00	34.36	19.13	15.23	1.31	1.56	1.09
G40164	17.75	12.00	5.75	58.75	42.50	16.25	3.31	3.54	2.83
PI 477036	18.75	11.75	7.00	79.91	50.48	29.43	4.26	4.30	4.20
G40174	30.75	11.75	19.00	108.41	56.08	52.33	3.53	4.77	2.75
G40144A	27.00	11.25	15.75	137.15	59.95	77.20	5.08	5.33	4.90
G40153	15.50	11.00	4.50	70.00	40.00	30.00	4.52	3.64	6.67
PI 440793	20.75	10.75	10.00	76.18	39.13	37.05	3.67	3.64	3.71
G40200	16.00	10.25	5.75	51.00	37.00	14.00	3.19	3.61	2.43

Neb T-6-s	12.25	10.00	2.25	15.75	13.75	2.00	1.29	1.38	0.89
PI 477033	21.25	9.75	11.50	104.00	63.50	40.50	4.89	6.51	3.52
G40270	17.50	9.00	8.50	57.50	23.25	34.25	3.29	2.58	4.03
PI 440801	18.75	9.00	9.75	90.88	52.85	38.03	4.85	5.87	3.90
G40177A1	13.00	8.75	4.25	34.00	22.50	11.50	1.73	2.57	0.00
G40145	26.75	8.75	18.00	227.50	65.00	162.50	8.50	7.43	9.03
G40147	14.25	8.25	6.00	64.30	42.15	22.15	4.51	5.11	3.69
W6 32480	10.25	8.25	2.00	20.00	13.75	6.25	1.95	1.67	3.13
PI 440806	18.00	7.75	10.25	73.78	42.25	31.53	4.10	5.45	3.08
G40068	18.50	7.75	10.75	133.78	75.75	58.03	7.23	9.77	5.40
G40146	21.50	7.75	13.75	67.50	22.50	45.00	3.14	2.90	3.27
G40234	18.75	7.50	11.25	59.25	30.25	29.00	3.16	4.03	2.58
G 40201	15.00	7.50	7.50	42.25	21.75	20.50	2.82	2.90	2.73
G40152	19.50	7.50	12.00	100.00	40.00	60.00	5.13	5.33	5.00
G40148	21.75	7.00	14.75	132.50	47.50	85.00	6.09	6.79	5.76
G40282	11.25	6.75	4.50	25.00	18.25	6.75	2.22	2.70	1.50
PI 440805	15.50	6.75	8.75	68.75	42.50	26.25	4.44	6.30	3.00
G40177B1	10.25	6.50	3.75	21.25	13.25	8.00	2.07	2.04	2.13
G40173A	15.50	6.50	9.00	28.25	17.50	10.75	1.82	2.69	1.19
G40128	10.75	6.25	4.50	130.65	73.65	57.00	12.15	11.78	12.67
G40276	13.75	6.00	7.75	41.00	22.50	18.50	2.98	3.75	2.39
PI 458874	16.75	6.00	10.75	103.21	44.83	58.38	6.16	7.47	5.43
G40301	12.00	6.00	6.00	36.88	25.75	11.13	3.07	4.29	1.86
G40142	6.00	6.00	0.00	5.00	5.00	0.00	0.83	0.83	-
G40177G	12.00	6.00	6.00	16.00	8.00	8.00	1.33	1.33	1.33
TB 1	25.00	5.75	19.25	145.07	55.60	89.47	5.80	9.67	4.65
G40172	10.25	5.75	4.50	40.00	22.50	17.50	3.90	3.91	3.89
G40229	9.25	5.50	3.75	25.50	14.75	10.75	2.76	2.68	2.87
G40157	10.25	5.50	4.75	16.25	8.75	7.50	1.59	1.59	1.58
G40303	14.25	5.50	8.75	37.38	25.25	12.13	2.62	4.59	1.39
G40158A	13.50	5.50	8.00	59.75	24.75	35.00	4.43	4.50	4.38
G40177F	10.00	5.50	4.50	33.50	23.75	9.75	3.35	4.32	2.17
PI 440800	8.75	5.25	3.50	33.93	18.18	15.75	3.88	3.46	4.50
PI 638926	13.50	5.25	8.25	92.50	33.25	59.25	6.85	6.33	7.18
G40173B	12.25	5.25	7.00	35.00	16.30	18.70	2.86	3.10	2.67
G40144C	8.00	5.25	2.75	12.00	6.50	5.50	1.50	1.24	2.00
G40159	12.25	5.25	7.00	43.38	9.63	33.75	3.54	1.83	4.82
G40156	12.75	5.00	7.75	57.50	22.50	35.00	4.51	4.50	4.52
PI 458873	12.75	5.00	7.75	68.50	33.25	35.25	5.37	6.65	4.55
G40304	10.00	5.00	5.00	34.50	20.00	14.50	3.45	4.00	2.90

PI 462026	12.00	5.00	7.00	22.63	9.25	13.38	1.89	1.85	1.91
G40022A	14.25	5.00	9.25	8.13	3.48	4.65	0.57	0.70	0.50
G40151	11.25	4.75	6.50	67.50	22.50	45.00	6.00	4.74	6.92
PI 440798	9.00	4.50	4.50	70.01	46.58	23.43	7.78	10.35	5.21
G40277	9.00	4.50	4.50	19.71	10.33	9.38	2.19	2.30	2.08
G40162	8.75	4.50	4.25	116.50	16.50	100.00	13.31	3.67	23.53
G40154	10.50	4.50	6.00	44.20	19.20	25.00	4.21	4.27	4.17
G40144	6.75	4.50	2.25	13.50	9.00	4.50	2.00	2.00	2.00
W6 32485	13.50	4.25	9.25	72.85	35.45	37.40	5.40	8.34	4.04
G40112	10.50	4.25	6.25	26.78	10.65	16.13	2.55	2.51	2.58
G40173C	6.00	4.25	1.75	18.50	4.25	14.25	3.08	1.00	8.14
PI 638925	9.75	4.25	5.50	22.53	10.30	12.23	2.31	2.42	2.22
G40177A	10.00	4.00	6.00	37.50	12.50	25.00	3.75	3.13	4.17
G40149	13.25	4.00	9.25	117.65	53.80	63.85	8.88	13.45	6.90
G40140	16.00	4.00	12.00	20.00	8.00	12.00	1.25	2.00	1.00
G40025	7.50	3.75	3.75	6.33	3.50	2.83	0.84	0.93	0.75
G40125	13.50	3.50	10.00	92.13	27.23	64.90	6.82	7.78	6.49
G40177D	5.50	3.25	2.25	27.75	4.25	23.50	5.05	1.31	10.44
Neb T-8a-S	14.75	3.25	11.50	27.03	8.75	18.28	1.83	2.69	1.59
G40271	3.50	3.25	0.25	4.50	3.25	1.25	1.29	1.00	5.00
G40127	8.25	3.25	5.00	83.80	42.75	41.05	10.16	13.15	8.21
G40038	16.00	3.00	13.00	116.38	48.70	67.68	7.27	16.23	5.21
G40163	5.50	3.00	2.50	35.00	25.00	10.00	6.36	8.33	4.00
G40110	5.25	3.00	2.25	71.11	47.48	23.63	13.54	15.83	10.50
PI 535233	11.00	2.75	8.25	38.86	11.63	27.23	3.53	4.23	3.30
G40166	2.50	2.50	0.00	7.50	7.50	0.00	3.00	3.00	-
G40058	8.50	2.50	6.00	45.06	10.13	34.93	5.30	4.05	5.82
G40120	7.00	2.50	4.50	99.53	50.55	48.98	14.22	20.22	10.88
G40300	10.00	2.50	7.50	20.10	5.10	15.00	2.01	2.04	2.00
G40122	3.75	2.50	1.25	38.00	13.95	24.05	10.13	5.58	19.24
G40176	8.50	2.25	6.25	59.75	17.20	42.55	7.03	7.64	6.81
G40173	4.75	2.25	2.50	18.75	10.00	8.75	3.95	4.44	3.50
G40021	15.00	2.25	12.75	121.76	21.53	100.23	8.12	9.57	7.86
G40165	10.50	2.00	8.50	56.25	16.25	40.00	5.36	8.13	4.71
G40279	3.50	2.00	1.50	7.88	5.63	2.25	2.25	2.82	1.50
G40062	9.25	2.00	7.25	34.50	9.80	24.70	3.73	4.90	3.41
PI 440792	6.75	2.00	4.75	34.96	11.98	22.98	5.18	5.99	4.84
G40010	12.75	2.00	10.75	11.30	3.90	7.40	0.89	1.95	0.69
PI 535227	6.50	1.75	4.75	54.20	11.90	42.30	8.34	6.80	8.91
G40042	14.25	1.75	12.50	6.81	0.73	6.08	0.48	0.42	0.49

G40066A	4.75	1.75	3.00	32.20	17.35	14.85	6.78	9.91	4.95
G40023	9.75	1.75	8.00	10.38	3.23	7.15	1.06	1.85	0.89
G40022	11.25	1.50	9.75	121.85	44.30	77.55	10.83	29.53	7.95
G40302	2.50	1.50	1.00	13.30	11.80	1.50	5.32	7.87	1.50
G40006B	3.25	1.50	1.75	9.50	8.75	0.75	2.92	5.83	0.43
G40037	13.50	1.25	12.25	46.23	15.10	31.13	3.42	12.08	2.54
G40119	5.50	1.25	4.25	47.43	11.93	35.50	8.62	9.54	8.35
TL-53S	13.50	1.00	12.50	22.73	2.50	20.23	1.68	2.50	1.62
W6 32481	3.75	1.00	2.75	28.38	17.13	11.25	7.57	17.13	4.09
G40037A	1.00	1.00	2.75	13.68	12.15	1.53	13.68	12.15	0.56
G40035	2.00	1.00	1.00	26.16	12.83	13.33	13.08	12.83	13.33
G40029	6.50	1.00	5.50	3.53	0.83	2.70	0.54	0.83	0.49
G40130	15.50	1.00	14.50	19.75	6.95	12.80	1.27	6.95	0.88
G40138	10.00	1.00	9.00	47.50	3.75	43.75	4.75	3.75	4.86
G40030	2.25	0.75	1.50	1.51	0.13	1.38	0.67	0.17	0.92
G40028	11.50	0.75	10.75	101.98	14.20	87.78	8.87	18.93	8.17
G40059	6.00	0.75	5.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40060	6.00	0.75	5.25	8.75	4.25	4.50	1.46	5.67	0.86
G40019	1.00	0.75	0.25	26.18	22.73	3.45	26.18	30.31	13.80
G40008	4.50	0.75	3.75	2.08	1.13	0.95	0.46	1.51	0.25
G40057	1.25	0.50	0.75	29.33	2.75	26.58	23.46	5.50	35.44
G40018	8.50	0.50	8.00	11.68	1.53	10.15	1.37	3.06	1.27
G40160	8.50	0.25	8.25	26.06	3.88	22.18	3.07	15.52	2.69
G40150	3.00	0.25	2.75	30.00	2.50	27.50	10.00	10.00	10.00
G40034	2.25	0.25	2.00	36.85	12.40	24.45	16.38	49.60	12.23
G40013D	5.00	0.25	4.75	5.10	0.90	4.20	1.02	3.60	0.88
G40020	9.50	0.25	9.25	9.06	0.13	8.93	0.95	0.52	0.97
G40013A	2.50	0.25	2.25	3.70	1.25	2.45	1.48	5.00	1.09
G40129	2.75	0.25	2.50	22.96	4.53	18.43	8.35	18.12	7.37
G40012	3.75	0.00	3.50	4.68	1.50	3.18	1.25	0.00	0.91
G40177A2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40177E 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W6 32483	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PI 638833	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40043	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40041	1.50	0.00	1.50	1.25	0.00	1.25	0.83	0.00	0.83
G40040	4.75	0.00	4.75	25.93	0.00	25.93	5.46	0.00	5.46
G40237	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40272	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40299	4.00	0.00	4.00	54.95	0.00	54.95	13.74	0.00	13.74

G40032	7.75	0.00	7.75	5.15	0.00	5.15	0.66	0.00	0.66
PI 477038	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PI 527335	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40036	1.00	0.00	1.00	3.75	0.00	3.75	3.75	0.00	3.75
G40067	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PI 477035	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PI 440795	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G40009	2.00	0.00	2.00	11.25	0.00	11.25	5.63	0.00	5.63
Silvestres									
G40177E	10.00	7.75	2.25	31.25	12.25	19.00	3.13	1.58	8.44
G40177E 1	7.75	3.50	4.25	61.28	30.30	30.98	7.91	8.66	7.29
G40192	6.00	4.25	1.75	40.11	20.78	19.33	6.69	4.89	11.05
G40206	2.75	2.75	0.00	15.00	15.00	0.00	5.45	5.45	0.00
G40228	9.00	5.00	4.00	12.25	6.00	6.25	1.36	1.20	1.56
G40262	4.00	1.75	2.25	11.50	5.00	6.50	2.88	2.86	2.89
G40274	6.25	1.00	5.25	38.83	10.20	28.63	6.21	10.20	5.45
Líneas									
TARS-Tep 23	5.00	0.50	4.50	8.68	3.00	5.68	1.74	6.00	1.26
TARS-Tep 29	9.25	5.75	3.50	44.15	15.00	29.15	4.77	2.61	8.33
TARS-Tep 32	26.25	15.25	11.00	159.03	111.85	47.18	6.06	7.33	4.29
Controles									
Soybean	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cowpea	7.25	0.00	7.25	77.03	0.00	77.03	10.62	0.00	10.62
Verano	14.00	2.50	11.50	42.76	15.58	27.18	4.48	10.23	3.23
DMS (P≤0.05)	10.63	6.93	6.79	32.65	28.04	27.72			

[β] NT= Número total, NAS= número área superficial (1-3 cm), NAI= número área inferior (3-10 cm), [D] PF=Peso fresco total, PFAS= Peso fresco área superficial (1-3 cm), PSAI= peso fresco área inferior (3-10cm), [ɡ] PPN= peso promedio total de un nódulo, PPAS= peso promedio total de un nódulo en el área superficial (1-3 cm), PPAI= peso promedio de un nódulo en el área inferior (3-10cm).

Los genotipos G40142A, G40141, G40144B, G40144A, G40145, G40200 fueron consistentemente superiores en ambas inoculaciones, teniendo valores respectivos de 52.25, 36.75, 20.5, 27, 26.75, 16 para el número total de nódulos y 52.28, 12.63, 94.38, 137.15, 227.5, 51 mg respectivamente, para el peso de nódulos. Los genotipos G40067, G40036, tuvieron 0, y 1.5

nódulos respectivamente, con pesos de 0, y 1.25 mg, encontrándose en el grupo de los genotipos inferiores en ambas inoculaciones.

G40161, G40153, PI 476858, PI440802, PI 549447, fueron parte de los genotipos con altos valores de nodulación con la cepa USDA 3254, pero que no fueron evaluados con ambas cepas. Los genotipos G40269, G40175, G40143, G40174, se expresaron con valores altos de nodulación, con la cepa USDA 3254, aunque se encontraron entre los más bajos en el experimento con las 2 cepas. Por el contrario los genotipos G40060, G40020, G40043 y G40040, tuvieron valores altos en los parámetros cuando se inocularon con 2 cepas, pero tuvieron valores bajos o ausencia de nodulación con la cepa USDA 3254.

Los genotipos G40043, G40237, G40272, G40036, G40067, no presentaron nodulación con la cepa USDA 3254, pero si cuando fueron inoculados con la combinación de las cepas, aunque se encontraron entre los genotipos con los valores más bajos.

Los siete genotipos silvestres incluidos presentaron nodulación con la cepa USDA 3254, con valores significativamente menores a los genotipos cultivados, pero similares al promedio de los genotipos evaluados en el experimento con 2 cepas. La línea TARS-Tep 32 tuvo un comportamiento muy diferente en presencia de una sola cepa, con valores de 26.25 nódulos y 159.03 mg, contrastante con los valores que obtuvo al ser inoculado con 2 cepas con valores de seis nódulos y 103 mg. 'Verano' presentó nodulación, sin embargo fueron estructuras de coloración amarilla, de menor tamaño y con poco peso, característico de nodulación inefectiva, lo cual es de esperarse siendo que la cepa inoculada no es el simbionte efectivo para el frijol común.

Con respecto a la ubicación de los nódulos en la raíz, no se observó de forma general un promedio mayor en la parte superficial (0-3 cm) o en la parte inferior (3-10 cm), algunos genotipos como

G40040, G40142, G40166, G40237 formaron de forma consistente sus nódulos en los primeros 3 cm. No se observó genotipos que consistentemente concentraran sus nódulos en la parte más profunda de la raíz.

V.3-Evaluación de poblaciones interespecíficas INB y SK

Se obtuvo nodulación en la población interespecífica INB, producto de la inoculación con las dos cepas de *Bradyrhizobium* (USDA 3254 + USDA 110). Las características correspondieron fenotípicamente a una nodulación efectiva, por su ubicación en la parte de la corona de la raíz y coloración rojiza; con características típicas de nódulos formados por las cepas de lento crecimiento, de mayor tamaño.

Se encontraron diferencias entre los miembros de la población de acuerdo a las variables evaluadas. Las líneas INB 806, INB 817, INB 832, INB 833, INB 836, INB 837, INB 839, INB 840, INB 841, INB 842 mostraron las combinaciones más altas (Tabla 9) de número de nódulos con valores entre 55-37 nódulos y un peso fresco de nódulos entre 271-417 mg por planta. Un padre recurrente mesoamericano ('ICA Pijao'), presentó características de buena nodulación con 36 nódulos y un peso de 248 mg por planta.

Tabla 9. Número de nódulos y peso (mg) de líneas híbridas interespecíficas INB inoculadas con las cepas USDA 110 + USDA 3254 de *Bradyrhizobium* evaluadas 21 días después de la inoculación en Mayagüez, PR. 2014.

Genotipo	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Genotipo	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
INB 817	55	293	INB 810	23	247
INB 834	53	240	INB 868	22	200
INB 841	53	333	INB 818	22	237
INB 842	52	267	INB 849	22	190
INB 837	52	283	INB 808	22	93
INB 844	50	270	INB 854	22	147

INB 833	49	317	INB 823	21	217
INB 832	48	310	INB 825	21	187
INB 839	45	330	INB 861	21	253
INB 850	42	260	INB 807	21	210
INB 809	41	367	INB 863	21	157
INB 845	39	193	INB 859	20	227
INB 830	39	203	INB 815	16	170
INB 806	39	417	INB 856	16	147
INB 871	39	237	INB 855	19	147
INB 831	38	260	INB 851	19	187
INB 822	37	270	INB 847	19	140
INB 840	37	377	INB 814	18	127
INB 829	36	340	INB 864	18	163
INB 836	36	387	INB 821	18	170
INB 813	36	247	INB 866	14	110
INB 838	36	297	INB 870	11	77
INB 819	34	240	INB 846	14	127
INB 824	34	230	G40001	17	130
INB 828	34	240	MEX 114	49	177
INB 843	33	240	GN-605-s	17	150
INB 852	32	290	GN-610-s	43	110
INB 826	30	330	TL-53-s	23	157
INB 827	29	210	TB-1	23	110
INB 835	29	293	PI 440788-s	16	137
INB 820	29	310	PI-321638-s	18	173
INB 812	29	253	PI 448806-A	11	163
INB 869	28	187	PI 321637-s	11	120
INB 873	28	153	PI 440788-A	38	167
INB 872	28	223	PI 440806-s	25	143
INB 858	27	293	PI 502217-s	21	167
INB 865	27	230	Neb-T-6-s	9	103
INB 848	27	153	Neb-T-8a-s	17	137
INB 857	27	230	Neb-T-15-s	19	103
INB 811	27	217	TARS-Tep 32	6	103
INB 816	26	237	TARS-Tep 22	4	60
INB 867	26	253	ICA Pijao	36	248
INB 862	26	297	Seda	20	160
INB 853	24	190	Beníquez	13	67
INB 860	24	270	Verano	10	67
DMS ($P \leq 0.05$)	18.523	146			

De los genotipos de tépari utilizados como control, MEX 114, GN-610-s, PI 440788-A, presentaron valores más altos en el número de nódulos que la línea parental conocida de la población, con valores de 49, 43 y 38 respectivamente. 'ICA Pijao', mostró una nodulación significativamente mayor a los demás cultivares de frijol común evaluados, para el número y peso de nódulos y con características típicas de una nodulación efectiva como coloración rojiza y ubicación cercana al área inoculada en la corona de la raíz. Los demás cultivares no solamente mostraron valores significativos más bajos, sino que las características fenotípicas de la nodulación fueron deficientes, en términos de la coloración y estructura de los nódulos.

La línea INB 806 fue significativamente mayor a un padre recurrente 'ICA Pijao' en el peso de los nódulos, no así en el número; aunque otros genotipos superaron a una línea parental en el número, no fue así en el peso. El parental de frijol tépari (G40001) mostró valores de nodulación de 17 nódulos y un peso fresco de 130 mg/ por planta, los cuales no son valores más altos, pero podría estar aportando la habilidad *per se* de nodulación con *Bradyrhizobium* y por ende la capacidad de formar nódulos con características más similares a los que se obtienen en interacciones con esta especie, a lo cual podría atribuirse la capacidad superior de ésta línea.

Estos datos son consistentes con estudios previos hechos con una población interespecífica, donde se evaluaron las interacciones simbióticas de híbridos interespecíficos de estas dos especies, en condiciones de invernadero con 7 progenies. En este experimento, se usaron inóculos combinados de 3 cepas distintas para cada especie, resultando en nodulación con ambos grupos de inóculo en las 7 progenies. Se concluyó que dos de ellas, tuvieron fijación eficiente con las cepas de *Rhizobium* y las otras cinco con las cepas de *Bradyrhizobium*. Dichas estimaciones se hicieron basadas en el peso seco de la planta, peso seco de nódulos y actividad total de nitrogenasa (Somasegaran y Hoben, 1991).

La contribución por parte de ambas especies, fue analizada con marcadores AFLP (Polimorfismos de la Longitud de Fragmentos Amplificados-por sus siglas en inglés), donde se estudiaron 60 líneas y se obtuvieron valores entre 5.2-8.8% de introgresión del tépari hacia el frijol común, dependiendo del tipo de retrocruzamiento utilizado (Muñoz *et al*., 2004).

Dos de las cepas de *Bradyrhizobium* utilizadas para obtener estas mediciones, fueron aisladas de otras especies de plantas (*Psophocarpus tetragonolobus* y *Voandzeia subterranea*), aunque tuvieron nodulación con frijol tépari en un experimento anterior, puede que no haya reflejado la mayor capacidad de interacción simbiótica por parte del frijol tépari, en contraste, las cepas utilizadas de *Rhizobium* fueron las cepas de conocida capacidad superior y específica CIAT 899 y CIAT 632.

Por otro lado, las líneas identificadas como superiores en la FBN muestran la combinación de la presencia de marcadores moleculares de importancia en el mejoramiento. La línea INB 806 muestra la presencia del marcador SW13 (Apéndice 4), las líneas INB 817, 839 y 840 muestran la presencia de los marcadores SW13 y SW12, y las líneas INB 817, 832, 833, 837, 841 y 842 mostraron combinaciones de la presencia de los marcadores SW13, SAP6 y SU91. Ninguna de las líneas mostró la presencia de los marcadores SR2 y PveIF4E[2]. El marcador SW13 es de importancia, ya que confirma la presencia del gen *I*, que aporta resistencia al BCMV, el marcador SW12, confirma la presencia del QTL asociado también a la resistencia del BGYMV. Los marcadores SAP6 y SU91, confirman la presencia de QTL's asociados a la resistencia de la bacteriosis común.

Las líneas INB 815, 835, 838, 846, 850, 851, 856, 865, 868, 869, 870, son de importancia para el mejoramiento, ya que combinan la presencia de los marcadores SW12, SW13, SAP6 y SU91.

En las líneas interespecíficas de Saskatchewan (Tabla 10), se encontró una respuesta diversa como producto de la inoculación, siendo significativas las diferencias encontradas entre los miembros de esta población.

Tabla 10. Número de nódulos y peso (g) de híbridos interespecíficos de la U. de Saskatchewan inoculados con las cepas USDA 110 y USDA 3254 de *Bradyrhizobium* evaluados 21 días después de la inoculación en Mayagüez, PR. 2014.

Genotipo	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Genotipo	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
A-5-6	62	250	B-1-13	24	168
A-2-5-Br	52	215	B-2-4	23	105
A-5-10	52	125	B-5-11	23	90
B-7-9	48	105	A-3-9	22	90
A-14-6	48	160	B-7-7 Br	21	130
A-11-8	47	170	A-10-12	21	55
A-3-10	42	125	A-9-5	21	45
A-5-5	41	138	A-3-1	21	73
A-14-10	40	153	B-5-5	20	100
A-14-8	39	155	B-2-9	19	143
B-11-1-N	39	203	B-11-3	19	105
A-14-4	38	178	B-4-5	19	123
B-1-8	37	213	B-6	18	88
B-11-6	37	193	B-7-8	18	113
B-1-4	36	168	B-6-1	17	110
A-2-8	35	103	A-3-13	17	68
A-11-11	34	90	A-9-9	16	133
A-3-12	33	123	A-2-5-Bl	16	70
A-5-7	33	170	B-2-7	14	60
A-3-5	31	123	B-4-2	12	50
B-11-8	30	143	B-6-4	10	65
A-3-4	30	133	B-3-12	9	60
A-11-7	29	73	B-6-9	5	30
B-6-5	29	110	B-3-11	4	10
B-1-9	28	123	Expresso	52	210
B-11-1	28	120	SK Tepary Black	21	85
B-6-12	27	148	Pintium	19	65
B-6-2	27	118	SK Tepary White	14	80
B-6-8	27	128	SK Tepary Gray	13	50

A-3-8	27	90	SK tepary Gold	13	53
B-11-10	26	118	NY5-161	13	43
B-3-1	25	180			
DMS (P≤0.05)	29.33	136			

Los genotipos A-5-6, A-2-5Br, A-14-6, tuvieron los valores más altos para las variables evaluadas con valores por planta de 62, 52 y 48 nódulos con pesos de 250, 215, 160 mg de peso fresco por planta, respectivamente. Los genotipos A-5-10, B-7-9, A-11-8, A-3-10 y A-5-5, tuvieron valores igualmente altos para el número de nódulos, pero no así para el peso.

Otro grupo de genotipos, B-1-8, B-11-1-N, B-3-1 y A-14-8, presentaron altos valores de peso de nódulos (mg por planta), con un menor número de nódulos. Todo el conjunto de genotipos mencionados, tuvieron un comportamiento superior a la línea parental conocida de frijol común NY5-161, que tuvo valores de 13 nódulos con un peso fresco de 43 mg, significativamente menor.

Al igual que en la población con padre recurrente mesoamericano, los valores superiores de líneas híbridas con respecto a sus padres de frijol común, sugiere una habilidad de las mismas para nodular con las cepas afines a los padres donantes. Para ambas poblaciones se tomaron nódulos al azar de las plantas inoculadas, previo al muestreo y se analizaron las secuencias de ADN de los mismos, los cuales corresponden con un 98% de similaridad a la cepa USDA 110, una de las dos cepas inoculadas, con respecto al gen *rec*A (Figura 2). Ninguno de los aislados de los nódulos de los cuales se amplificó la cepa ocupante correspondió a la cepa USDA 3254, sin embargo no se pueden hacer inferencias de una ocupancia absoluta de la cepa USDA 110 siendo que no se tomó una muestra de cada planta, solo se evaluaron plantas al azar. En ninguno de los nódulos se encontró similaridad con secuencias de cepas de *Rhizobium*.

En la prueba con Azul de Bromotimol, los cultivos establecidos a partir de los nódulos mostraron una coloración azul en el medio (Apéndice 5), sugiriendo el crecimiento correspondiente a bacterias del género *Bradyrhizobium*, lo cual se comparó durante 72 horas de crecimiento, teniendo en conjunto platos en las mismas condiciones con todos los aislados de ambas especies como referencia. Esta prueba, se realizó a partir de un nódulo de cada planta, intentando tener una mejor representación de los posibles ocupantes en las raíces.

La respuesta mostrada por 'ICA Pijao', en términos de su apariencia fenotípica deseada en la nodulación con cepas de *Bradyrhizobium,* sugiere la importancia del estudio más amplio de la habilidad de genotipos específicos de *Phaseolus vulgaris* con este género de cepas.

V.4-Evaluación de nodulación de aislados de Puerto Rico en frijol tépari

Los aislados de Puerto Rico presentaron nodulación y se encontró diferencias significativas tanto entre los aislados como entre los genotipos con los que se evaluaron (Tabla 11). Para el número de nódulos la cepa de Juana Díaz fue significativamente mayor a las demás cepas, con 23.8 nódulos/planta, no hubo diferencia entre las cepas Corozal, USDA 3254 e Isabela para esta variable con 4.3, 2.9 y 2.2 nódulos respectivamente. En el peso, la cepa de Juana Díaz fue igualmente superior con 177.5 mg por planta. No fueron diferentes entre sí las cepas USDA 3254 y Corozal con 77.5 y 65 mg por planta, y ambas fueron superiores a la cepa Isabela con 32.5 mg por planta.

Para la variable diámetro las cepas Corozal, Isabela y USDA 3254 fueron superiores a la cepa de Juana Díaz, indicando que en general las tres forman nódulos de mayor tamaño. Con respecto a su ubicación, la cepa Juana Díaz formó los nódulos más cerca a la raíz, teniendo en promedio una distancia de 0.2 cm desde el punto central de la raíz hasta el primer nódulo.

Tabla 11. Número de nódulos, peso de nódulos (mg), diámetro de nódulos (mg) y distancia del primer nódulo, de rizobios aislados en Puerto Rico estudiados con 10 genotipos de frijol tépari en Mayagüez, Puerto Rico, 2014.

Fuente	Estado Biológico	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Diámetro de nódulos (cm)	Distancia primer nódulo (cm)∞
Aislados					
Juana Díaz		23.8	177.5	0.16	0.20
Corozal		4.3	65.0	0.24	1.26
Isabela		2.9	32.5	0.21	1.14
USDA 3254		2.2	77.5	0.27	2.89
DMS (P≤0.05)		4.95	24.74	0.06	1.01
Genotipos					
G40066A	Cultivado	12.72	220	0.37	1.43
G40029	Cultivado	9.03	107.5	0.26	2.03
G40001	Cultivado	7.75	95	0.19	0.86
G40041	Cultivado	6.84	70	0.26	2.38
G40060	Cultivado	9.94	70	0.24	1.01
G40111	Cultivado	11.63	70	0.24	1.48
G40022A	Cultivado	8.75	57.5	0.18	0.81
G40173	Cultivado	7.22	47.5	0	1.77
12IS-9806-1	Cultivado	0.69	32.5	0.5	0.58
DMS (P≤0.05)		4.945	37.11	0.095	1.510

∞ distancia tomada desde las primeras raíces basales.

No hubo diferencia en la distancia entre las cepas Corozal e Isabela con 1.26 y 1.14 cm desde el centro de la raíz y la cepa USDA 3254 fue diferente de los 3 aislados de Puerto Rico para esta variable, formando su primer nódulo a 2.89 cm desde el centro de la corona.

El conjunto de cepas evaluado de las diferentes fuentes, ha tenido un patrón de nodulación similar con el frijol tépari, con una tendencia a tener un menor número de nódulos de mayor tamaño, a

excepción de la cepa Juana Díaz que consistentemente tuvo una tendencia a formar nódulos de menos tamaño y en mayor cantidad. Sin embargo, estas evaluaciones solo se condujeron con un número limitado de genotipos.

La cepa USDA 3254 con este grupo de genotipos tuvo promedios en el número de nódulos y peso, menores que los obtenidos en el promedio de la evaluación con el panel de tépari completo. Aunque no se puede estimar si la respuesta de estos genotipos con las cepas de Puerto Rico es representativa de la diversidad del tépari, pudo confirmarse su capacidad para nodular con esta especie de plantas y en el grupo evaluado presentó características fenotípicas de nodulación efectiva. Adicionalmente, se puede considerar el efecto de haber realizado esta evaluación en una localidad diferente, Juana Díaz.

V.5-Evaluación de genotipos superiores por su FBN en campo

En el experimento de campo (Tabla 12), se observó nodulación en todas las líneas INB, siendo significativamente superiores en el número de nódulos INB 806, INB 817, INB 826, INB 829, INB 846, INB 873, con valores entre 12-26 nódulos por planta. Dichas líneas fueron seleccionadas en condiciones de invernadero por ser superiores en sus valores de nodulación entre el grupo de 68 líneas (Tabla 9), a excepción de la línea INB 846 que en éstas condiciones tuvo promedios correspondientes al grupo de líneas inferiores.

Las líneas INB 835 e INB 848, presentaron los valores más bajos para el número de nódulos con 3 y 2 nódulos por planta respectivamente. Dichas líneas también se encontraron entre el grupo de líneas inferiores de esta población cuando se evaluaron en condiciones de invernadero. De las líneas SK incluidas presentaron nodulación A-5-10, B-11-8, D-6-12, con valores significativamente menores a los de las líneas INB.

Tabla 12. Valor agronómico, ubicación, color y número de nódulos de líneas interespecíficas INB y SK, y líneas de tépari inoculadas con la cepa USDA 3254. Sub estación Experimental Agrícola en Isabela, Puerto Rico. 2014.

Genotipo	Valor Agronómico	Ubicación	Color	Número de nódulos
INB 806	3	3	3	23
INB 817	2	2	2	26
INB 826	3	2	2	12
INB 829	4	2	2	14
INB 835	4	2	2	3
INB 846	4	2	2	19
INB 848	4	2	2	2
INB 873	4	2	2	18
A-5-6	4	2	0	0
A-5-10	3	1	2	2
B-11-8	4	1	2	3
D-6-12	3	2	5	2
G40001	4	3	3	2
G40025	-	-	-	-
G40028	-	-	-	-
G40037A	-	-	-	-
G40144	-	-	-	-
G40165	4	2	3	6
G40177E	-	-	-	-
SK Tepary Gray	3	2	2	3
IBC 301-204	4	1	1	6
TARS-LFR1	4	3	3	9
ICA Pijao	4	2	2	8
Verano	4	1	1	3
DMS ($P \leq 0.05$)				17.46

Valor Agronómico escala de 1 a 9, siendo 1=mejor apariencia, ubicación= tomada desde el centro de la corona de la raíz, color, 1=nódulos con coloración rosada y3= nódulos amarillos o verdes.

De los siete genotipos de tépari de la colección de CIAT, solamente G40001 y G40165 germinaron y presentaron nodulación, ambos fueron identificados en la evaluaciones anteriores como superiores cuando fueron inoculados con las cepas USDA 3254 y con el conjunto de USDA 110 + USDA 3254. Éstos fueron menores en comparación con el grupo, sin embargo como se discutió

en los resultados de experimentos anteriores, la tendencia observada de la nodulación, es de características diferentes al frijol común, siendo menor en número pero mayor en tamaño.

'ICA Pijao', tuvo durante los experimentos una tendencia superior a los demás genotipos de frijol común, sin embargo en condiciones de campo se comportó igual que las líneas IBC 301-204 y TARS-LFR1 y la variedad 'Verano' en las características de la nodulación.

Cuando se asignó una evaluación al color observado, los genotipos superiores en promedio fueron INB 809, G40001 y TARS-LFR1, que mostraron la totalidad de sus nódulos con coloración rojiza, característica deseable por indicar la actividad del nódulo. Las mismas líneas tuvieron la evaluación más alta en la ubicación, observándose sus nódulos en el área de las raíces basales cercanas a la corona.

En general, se observó un buen valor agronómico de las diferentes líneas, con valores entre 2-4, en una escala de 1-9, especialmente tomando en cuenta la ausencia de fertilización nitrogenada, aunque no se pudo realizar evaluaciones del peso de la planta o cosecha, dado que la mayor parte de las plantas se evaluó a floración para la nodulación.

V.6-Filogenia de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* construida con base en los genes *rec*A, *atp*D y *nod*C.

Para la secuenciación de las diferentes cepas utilizadas (Tabla 4) basada en el gen *nod*C, se obtuvo amplificaciones de aproximadamente 930 pb mayormente con la combinación de primers nodCF y nodCl. Cuando se obtuvo un producto con una sola banda en PCR, se realizó la purificación de forma directa, en los casos donde se obtuvo bandas múltiples, se cortó desde el gel de agarosa la banda correspondiente al producto esperado (Apéndice 6). Para las cepas en las cuales no se obtuvo producto con esta combinación de iniciadores, se amplificó con las demás combinaciones. USDA

76, USDA 3254, USDA 94 fueron amplificadas con el iniciador nodCF4. Corozal-PR fue amplificada con el iniciador nodCFu e Isabela y Juana Díaz con el iniciador nodCFn. El árbol filogenético para este gen (Figura 1), mostró una buena correlación con el

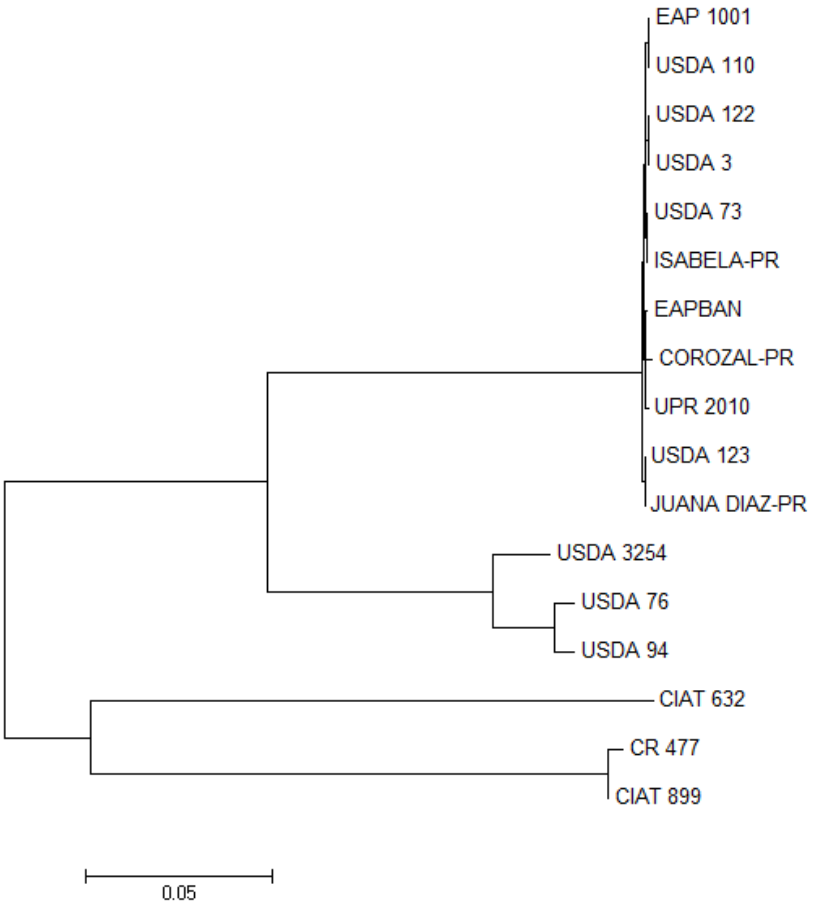


Figura 1. Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *nod*C de 810 pb.

rango de hospederos de la planta, lo cual es consistente con estudios realizados con otros grupos de cepas tanto de *Rhizobium* como de *Bradyrhizobium* (García-Fraile *et al*., 2010, Díaz-Alcántara *et al*., 2013). El grupo de cepas de *Bradyrhizobium*, formó un conglomerado robusto, que incluye las cepas UPR 2010, Corozal, Isabela y Juana Díaz, que no habían sido clasificadas anteriormente,

con una homología entre 85-99%, que sugiere un ancestro común entre dichas cepas, clasificadas cercanas a la cepa USDA 110. Las cepas USDA 3254, USDA 76 y USDA 94 formaron un conglomerado con una homología del 97%. Las cepas de *Rhizobium* formaron otro conglomerado, en el cual la cepa CIAT 632 se ubicó en un sub conglomerado y las cepa CR 477 (no clasificada anteriormente), se formó en otro sub conglomerado con la cepa CIAT 899 con un 98% de homología.

Para la secuenciación de las cepas basada en el gen *rec*A, se obtuvo las mejores amplificaciones con la combinación de iniciadores TSrecAf y TSrecAr, para casi todas las cepas de *Bradyrhizobium* se obtuvo una sola banda, utilizándose para la secuenciación el producto directo de PCR (Apéndice 7) y en los casos donde dos bandas fueron visualizadas se cortó a partir del gel la banda del tamaño deseado. Las cepas de *Rhizobium* se amplificaron modificando diferentes temperaturas con este mismo iniciador para confirmar la visualización de la banda deseada, obteniendo para éstas cepas, una mejor banda con una temperatura de alineamiento de 56˚C. Dichas secuencias también se confirmaron con las combinaciones de iniciadores: (recAfw1+recArv1 y recAfw1+recArv2), que mostraron las mejores bandas para los 3 aislados de *Rhizobium*.

El árbol filogenético obtenido con las secuencias de este gen (Figura 2), formó dos conglomerados principales, las cepas de *Rhizobium* en un conglomerado con un sub conglomerado que incluye las cepas CIAT 899 y CR 477 (no clasificada anteriormente para este gen), que fueron 98% homólogas y otro con la cepa CIAT 632. El otro conglomerado principal, estableció un sub conglomerado con las 3 cepas de *Bradyrhizobium elkanii*, USDA 3254, USDA 94 y USDA 76 y otro sub conglomerado con las demás cepas de *B. japonicum* y B. *diazoefficiens*, que incluye las cepas

aisladas en Puerto Rico, la cepa EAPBAN y la cepa UPR 2010, no clasificadas anteriormente para este gen.

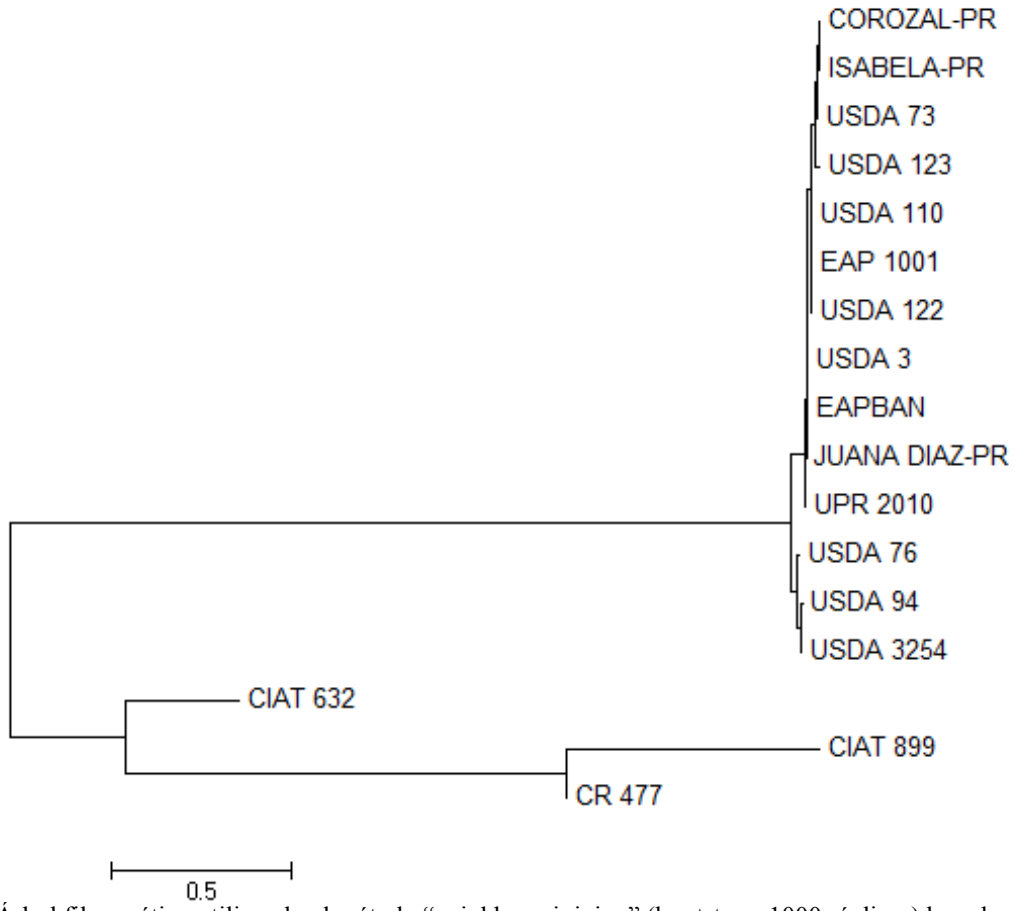


Figura 2. Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *rec*A de 505 pb.

Filogenias construidas a partir de este gen conservado, soportan las filogenias establecidas de la SSU en otros estudios (Gaunt, *et al*., 2001, Menna *et al*., 2009). La mayor variabilidad se encontró cuando se establecieron los análisis basados en el gen *atp*D (Figura 3), en donde al igual que en los genes *nod*C y *rec*A se establecieron dos conglomerados principales, pero una mayor diversidad se observó en el clado del género *Bradyrhizobium*, en donde el grupo de la cepa USDA 110 formó un sub conglomerado que incluye las cepas EAPBAN y UPR 2010 (no

clasificadas anteriormente), con un 98% de similaridad, otro sub conglomerado que incluye las cepas de de *Bradyrhizobium elkanii*, 96% homólogas entre ellas para este gen, y un tercer

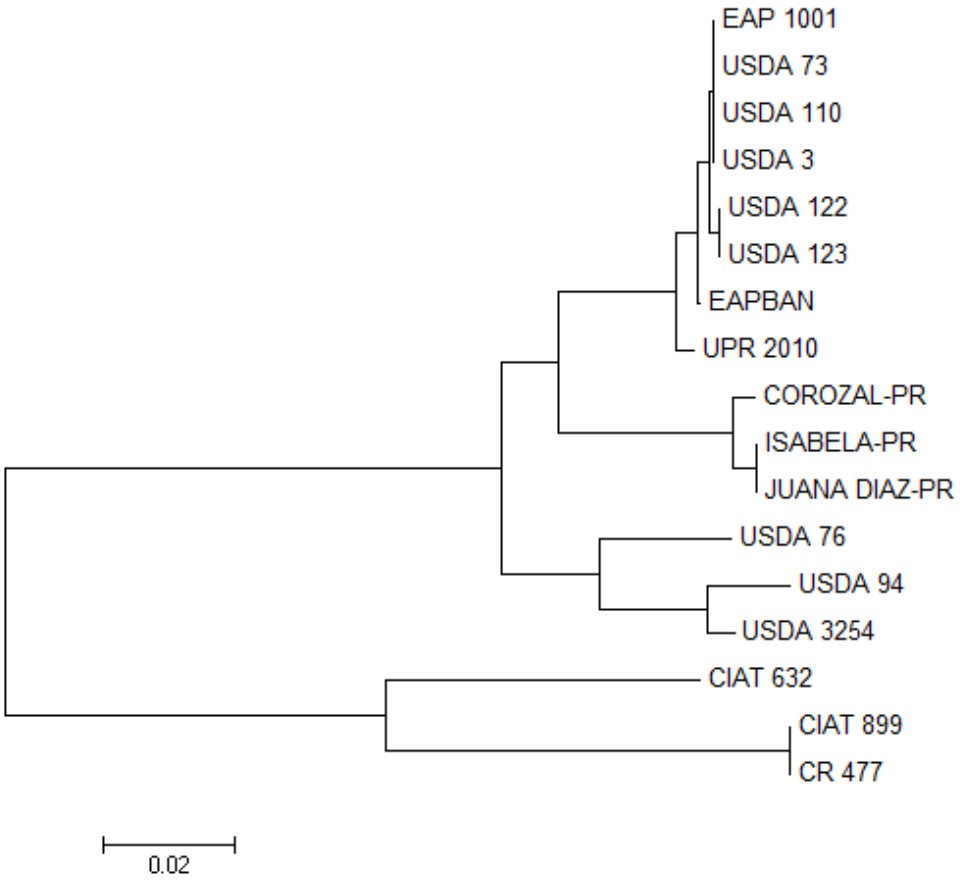


Figura 3. Árbol filogenético utilizando el método "neighbour-joining" (bootstrap, 1000 réplicas) basado en secuencias alineadas de 17 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* del gen *atp*D.

sub conglomerado que agrupa los aislados de Puerto Rico con un 97% de similaridad entre ellas. Estos resultados son consistentes por los encontrados por Menna *et al*., 2009, en donde el gen *atp*D, mostró la mayor variabilidad dentro de 4 genes conservados estudiados.

V. 7- Desarrollo de población interespecífica

Aproximadamente 300 polinizaciones fueron realizadas utilizando diferentes combinaciones de los padres, de las cuales la mitad fueron utilizando plantas de tépari como madre y la mitad utilizando frijol común como madre. De los 150 cruzamientos realizados en tépari, 40 fueron cruzamientos exitosos, pero presentando embiones con crecimiento subóptimo, los cuales fueron rescatados *in vitro* (Figura 4), consiguiéndose rescatar 20 embriones. De éstos, se consiguió crecer tres plantas, las cuales no produjeron flores con polen viable, y las polinizaciones que se intentaron realizar usando dichas flores como madres, no fueron existosas.

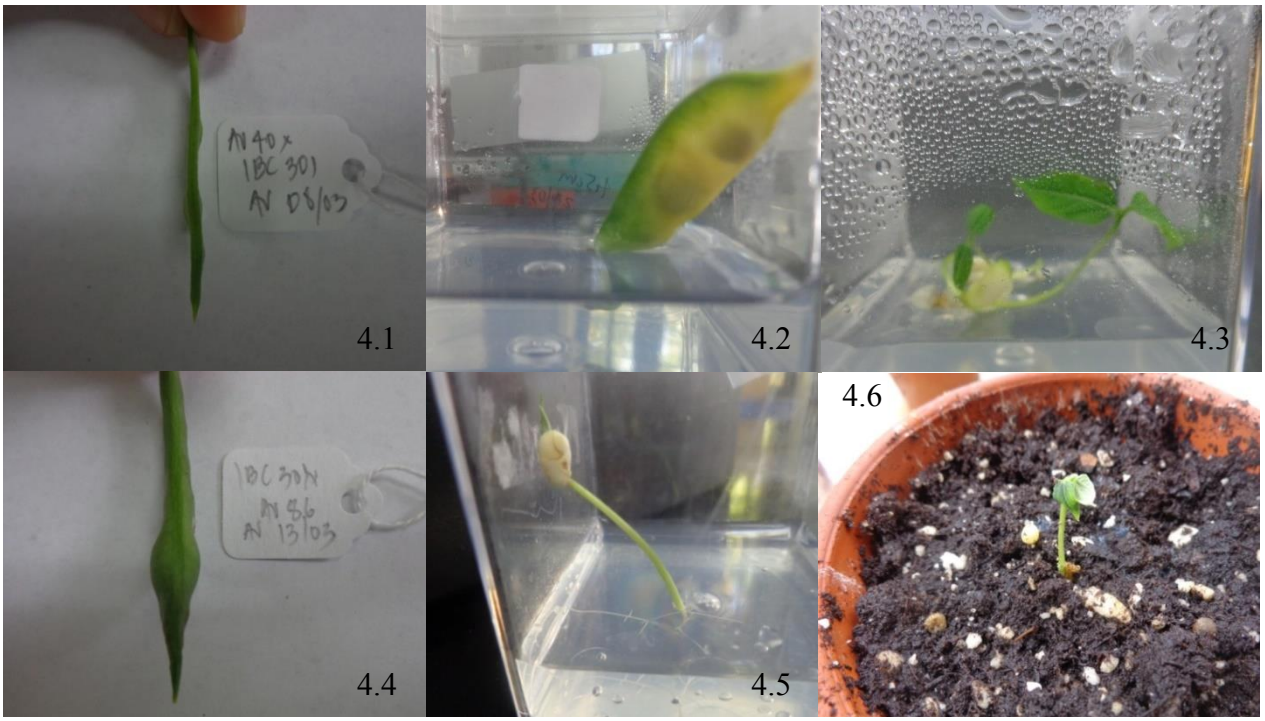


Figura 4. Rescate in vitro de embriones de híbridos interespecíficos. 4.1= vainas con embriones sin crecimiento, 4.2= vainas *in vitro* 12 días después de transferencia, 4.3= semillas germinadas a los 8 días a partir de vainas transferidas, 4.4= vainas con embriones con crecimiento limitado, 4.5 semillas germinadas a partir de embriones transferidos directamente al medio, 4.6= aclimatación de plantas en maceteros con medio estéril.

solamente 35 fueron rescatados *in vitro*, de los cuales dos pudieron crecer en maceteros y una de éstas plantas tuvo formación de flores. Dichas flores fueron retrocruzadas con polen de la planta materna y produjeron 6 semillas viables (Figura 5). Dichas plantas se mantuvieron dentro del laboratorio para tener un mejor control de las condiciones.

Figura 5. Desarrollo de híbrido interespecífico. 5.1= transferencia de embrión a medio de crecimiento estéril, crecimiento del híbrido F1 con sus respectivos parentales (izquierda *P. vulgaris*, centro= híbrido interespecífico, derecha= *P. acutifolius*), 5.3= 6 semillas producidas producto de la retrocruza con polen de frijol tépari.

Las 6 plantas producto del cruzamiento entre G40110 × IBC 301-204, fueron establecidas produciendo flores, que se intentaron retrocruzar hacia ambos padres en ambos sentidos, siendo exitoso el retrocruce hacia la línea parental de tépari utilizando el híbrido interespecífico como madre. Las semillas cosechadas, se mezclaron en una sola población, y se establecieron en condiciones de invernadero. Dichas plantas tuvieron diferencias fenotípicas en su crecimiento, con tipos de hojas primarias correspondientes a plantas de ambos géneros, distancia entre nudos de los primerios trifolios correspondientes al frijol común, pero con hábito de crecimiento trepador a partir del tercer trifolio, correspondiente a las características del parental de tépari (Figura 6).

Figura 6. Tipo de crecimiento de plantas retrocruzadas hacia parental tépari. 6.1= hojas primarias correspondientes a la morfología de tépari, 6.2= hojas primarias correspodientes a la morfología de frijol común, 6.3= plantas con crecimiento anormal.

Dichas plantas produjeron diferentes tipos de vainas, siendo algunas completamente vanas, en algunos casos llenando granos parcialmente y otras con un máximo de 6 a 7 granos por vaina (Figura 7). Los granos con mejores características corresponden a semillas redondas color negro brillante, sugiriendo la herencias de caraterísticas de ambos padres, siendo que el parental tépari corresponde a semilla color negro opaco, y el parental de frijol común rojo claro brillante. La mayor parte de las semillas tuvieron una formación pobre de los cotiledones, y un pequeño grupo tuvo color rojo, pero con características no deseables (Figura 7.3).

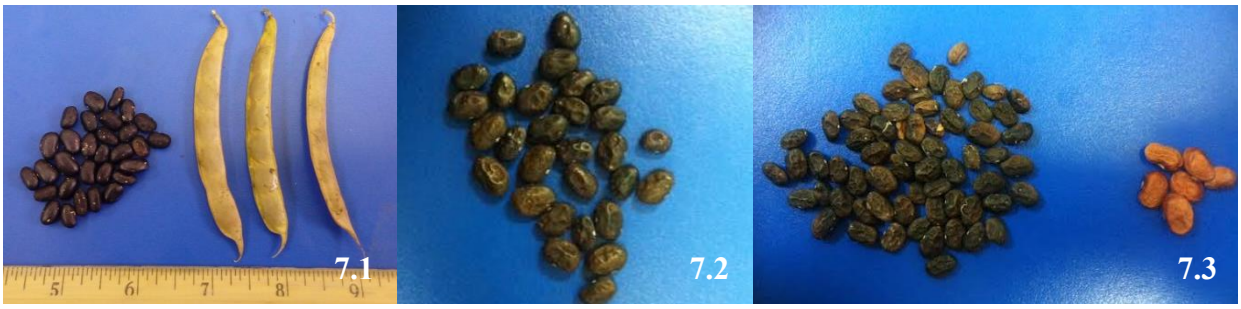


Figura 7. Tipo de crecimiento de vainas y semillas interespecíficas retrocruzadas hacia el parental tépari. 7.1= semillas redondas color negro brillante y vainas con 6-7 semillas, 7.2= semillas color negro opaco y negro brillante, redondas y planas con desarrollo limitado, 7.3= semillas color negro opaco y rojo con desarrollo no deseado.

V.8-Reacción de frijol tépari al BCNMV

Los 315 genotipos de frijol tépari inoculados con la cepa NL 3 D de BCMNV, mostraron diferentes síntomas. La mayor parte de las plantas fueron susceptibles y produjeron síntomas de mosaico en las hojas inoculadas (tomando como referencia los síntomas de mosaico conocidos en el frijol común) y fueron positivos a la prueba de ELISA (Tabla 13). Más de 150 de las accesiones estudiadas presentaron una reacción fenotípica susceptible, siendo posible visualizar los síntomas conocidos en el frijol común como reacción a la presencia del virus, que pudieron observarse de forma leve, severa y con enrollamiento de las hojas (Figura 8.a.3, 8.a.4, 8.b.3). Sin embargo, no hay una total correspondiencia entre la apariencia en la severidad del virus con el valor en la prueba ELISA, siendo que algunos genotipos con apariencia de mosaico severo, presentaron valores bajos en la prueba de ELISA, y genotipos con mosaico leve, presentaron valores altos en la prueba de ELISA. Adicionalmente, genotipos que tuvieron apariencia fenotípica resistente como G40018, G40061, G40199, presentaron valores consistentes positivos para la prueba ELISA.

Tabla 13. Genotipo, estado biológico, lugar de recolección, respuesta fenotípica a la cepa de *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) NL 3 D en las hojas primaria y trifoliada, y resultados de la prueba ELISA en genotipos del panel de diversidad de tépari (TDP) y líneas de mejoramiento del programa de USDA-ARS-TARS. Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015.

Genotipo[ɤ]	Estado Biológico	Respuesta a NL 3 D[ł]			
		Hoja Primaria	Trifolio	ELISA	
G40001	Cultivated	VN	M, Lc	+[Ω]	3.42
G40006B	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.73
G40008	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.39
G40009	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.55
G40010	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.4
G40012	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.49
G40013A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.49
G40013D	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.51
G40018	Cultivated	NS	NS	+	0.66
G40019	Cultivated	VN	NS	+	0.65

G40020	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.14
G40021	Cultivated	VN	mM, Lc	+	1.44
G40022	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.47
G40022A	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.46
G40023	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.38
G40025	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.48
G40028	Cultivated	VN	mM	+	0.95
G40029	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.85
G40030	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.45
G40032	Cultivated	NS	mM	+	3.23
G40034	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.45
G40035	Cultivated	NLL, VN	NS	+	1.3
G40036	Cultivated	VN	mM	+	3.38
G40037	Cultivated	VN	M	+	2.24
G40037A	Cultivated	VN	M	+	3.37
G40038	Cultivated	NS	M	+	3.31
G40039	Cultivated	VN	M, Lc	+	1.29
G40040	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.11
G40041	Cultivated	VN	mM	+	3.07
G40042	Cultivated	VN	M	+	2.89
G40043	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.64
G40044	Cultivated	VN	SN, M, Lc	+	3.39
G40045	Wild	VN	M	+	2.88
G40046	Wild	VN	M, Lc	+	2.69
G40048	Wild	VN	M, Lc	+	0.68
G40049	Wild	NS	M, Lc	+	0.73
G40050	Wild	VN	M, Lc	+	2.16
G40051	Wild	VN	M, Lc	+	2.69
G40052	Wild	VN	mM	+	2.12
G40053	Wild	VN	SN, M, Lc	+	1.45
G40054	Wild	VN	M, Lc	+	0.64
G40055	Wild	NS	M, Lc	+	1.45
G40056	Wild	VN	M	+	2.65
G40057	Cultivated	VN	mM	+	3.47
G40058	Cultivated	NS	NS	+	1.71
G40059	Cultivated	VN	mM	+	1.49
G40060	Cultivated	NS	mM	+	3.42
G40061	Cultivated	NS	NS	+	0.65
G40066A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.45
G40067	Cultivated	NS	sM	+	3.44
G40068	Cultivated	VN	M	+	3.42

G40071	Wild	VN	mM	+	3.11
G40072	Wild	VN	M, Lc	+	3.33
G40073	Wild	VN	sM	+	3.39
G40074	Wild	VN	SN, M, Lc	+	3.31
G40075	Wild	NS	mM	+	0.49
G40076	Wild	VN	M, Lc	+	3.23
G40077	Wild	VN	M, Lc	+	2.83
G40078	Wild	NLL,VN	SN, M, Lc	+	3.49
G40080	Wild	VN	sM	+	1.33
G40081	Wild	NS	mM	+	2.92
G40082	Wild	VN	M, Lc	+	3.45
G40083	Wild	VN	mM	+	2.6
G40086	Wild	VN	M	+	1.52
G40087	Wild	NS	mM	+	3.45
G40088	Wild	VN	M, Lc	+	1.58
G40089	Wild	VN	mM	+	1.61
G40091	Wild	NLL,VN	mM	-	0.07
G40092	Wild	VN	M, Lc	+	0.26
G40093	Wild	NS	M, Lc	+	1.51
G40094	Wild	VN	mM	+	0.78
G40095	Wild	VN	mM	+	2.65
G40096	Wild	VN	mM	+	3.44
G40098	Wild	VN	mM	+	2.85
G40101	Wild	VN	mM	+	1.17
G40103	Wild	NS	mM	+	3.03
G40105	Wild	VN	SN, M, Lc	+	3.16
G40106	Wild	VN	M	+	3.17
G40108	Wild	VN	sM, Lc	+	3.44
G40110	Cultivated	VN	M, Lc	+	1.01
G40111	Cultivated	NS	M, Lc	+	0.7
G40112	Cultivated	VN	mM	+	3.08
G40113	Wild	VN	mM	+	1.46
G40114	Wild	VN	M, Lc	+	2.05
G40115	Wild	VN	mM	+	2.74
G40116	Wild	VN	mM	+	3.47
G40117	Wild	VN	M, Lc	+	3.2
G40117A	Wild	VN	M, Lc	+	1.28
G40119	Cultivated	VN	mM	+	3.19
G40120	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.9
G40122	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.06
G40125	Cultivated	NLL, VN	sM	+	2.21

G40127	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.02
G40128	Cultivated	VN	sM	+	3.39
G40129	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.7
G40130	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.15
G40138	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.19
G40140	Cultivated	VN	mM	+	3.44
G40141	Cultivated	VN	mM	+	2.81
G40142	Cultivated	NS	M	+	3.42
G40142A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.51
G40143	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.99
G40144	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.94
G40144A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.41
G40144B	Cultivated	VN	SN, M, Lc	+	3.4
G40144C	Cultivated	VN	mM	+	3.14
G40145	Cultivated	VN	mM	+	3.39
G40146	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.82
G40147	Cultivated	NS	mM	+	3.44
G40148	Cultivated	VN	mM	+	2.14
G40149	Cultivated	VN	mM	+	3.24
G40150	Cultivated	VN	mM	+	3.41
G40151	Cultivated	NS	mM	+	2.4
G40152	Cultivated	NS	mM	+	3.45
G40153	Cultivated	NS	mM	+	2.14
G40154	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.14
G40156	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.4
G40157	Cultivated	VN	mM	+	3.02
G40158A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.44
G40159	Cultivated	NS	M, Lc	+	1.97
G40160	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.83
G40161	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.29
G40162	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.32
G40163	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.43
G40164	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.41
G40165	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.38
G40166	Cultivated	VN	mM	+	2.93
G40168	Wild	VN	M, Lc	+	2.17
G40169	Wild	VN	M, Lc	+	2.37
G40172	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.23
G40173	Cultivated	VN	M	+	3.21
G40173A	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.48
G40173B	Cultivated	NS	mM	+	2.62

G40173C	Cultivated	NS	mM	+	3.4
G40174	Cultivated	VN	mM	+	0.74
G40175	Cultivated	NS	mM	+	3.53
G40176	Cultivated	VN	M	+	3.48
G40177A	Weedy	VN	mM, Lc	+	0.24
G40177A1	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.77
G40177A2	Weedy	VN	M	+	3.33
G40177B1	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.98
G40177C	Weedy	VN	mM	+	2.75
G40177D	Weedy	VN	M, Lc	+	3.52
G40177E	Wild	NLL, VN	mM	+	3.09
G40177E1	Wild	VN	M, Lc	+	3.43
G40177E2	Weedy	VN	sM	+	3.16
G40177E3	Wild	NLL, VN	M, Lc	+	3.36
G40177F	Weedy	VN	M, Lc	+	3.42
G40177G	Weedy	VN	sM	+	2.57
G40179	Wild	VN	SN, M, Lc	+	3.42
G40180	Wild	NS	M, Lc	+	3.03
G40181	Wild	NS	mM	+	2.33
G40187	Wild	VN	mM	+	0.69
G40188	Wild	VN	M, Lc	+	0.35
G40189	Wild	VN	SN, mM	+	0.98
G40190	Wild	VN	M, Lc	+	3.2
G40191	Wild	VN	M, Lc	+	3.51
G40192	Wild	NS	M, Lc	+	0.91
G40193	Wild	VN	mM	+	0.46
G40194	Wild	VN	SN, mM	+	3.49
G40195A	Wild	NS	M, Lc	+	2.75
G40195B	Wild	NLL, VN	M, Lc	+	1.87
G40196	Wild	NS	M, Lc	+	3.25
G40197	Wild	VN	M, Lc	+	2.4
G40199	Wild	NS	NS	+	3.47
G40200	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.49
G40201	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.43
G40202	Wild	VN	SN, mM	+	2.11
G40203	Wild	NS	M, Lc	+	3.06
G40204	Wild	NS	M, Lc	+	3.49
G40205	Wild	VN	M, Lc	+	2.23
G40206	Wild	VN	M, Lc	+	2.78
G40207	Wild	NS	M, Lc	+	3.43
G40208	Wild	VN	M, Lc	+	2.71

G40209	Wild	NLL, VN	mM	+	2.94
G40210	Wild	NS	M, Lc	+	1.8
G40210A	Wild	VN	M, Lc	+	2.22
G40211	Wild	NS	M, Lc	+	2.67
G40212	Wild	VN	M, Lc	+	0.9
G40213	Wild	NLL,VN	SN, mM	+	3.39
G40213A	Wild	VN	SN, mM	+	3.17
G40214	Wild	VN	SN	+	0.81
G40216	Wild	VN	M, Lc	+	2.53
G40217	Wild	VN	M, Lc	+	1.73
G40218	Wild	VN	M, Lc	+	2.98
G40219	Wild	VN	dD	+	3.36
G40220	Wild	VN	mM	+	2.84
G40221	Wild	VN	M, Lc	+	3.19
G40222	Wild	VN	M, Lc	+	3.2
G40224	Wild	VN	M, Lc	+	3.57
G40225	Wild	NS	M, Lc	+	3.27
G40226	Wild	VN	M, Lc	+	2.22
G40227	Wild	VN	M, Lc	+	3.6
G40228	Wild	NS	sM	+	3.58
G40229	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.07
G40230	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.97
G40231	Wild	VN	M, Lc	+	3.16
G40231A	Wild	VN	M, Lc	+	2.97
G40232	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.59
G40233	Wild	VN	M, Lc	+	3.21
G40234	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.8
G40235	Wild	NS	M, Lc	+	3.17
G40236	Wild	NS	mM	+	3.61
G40237	Cultivated	NS	M	+	2.85
G40237A	Cultivated	VN	M, Lc	+	2.93
G40238	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.26
G40242	Wild	NS	M, Lc	+	0.86
G40245	Wild	VN	SN, M, Lc	+	3.15
G40246	Wild	VN	M, Lc	+	2.53
G40247	Wild	VN	M, Lc	+	2.99
G40248	Wild	VN	M, Lc	+	3.61
G40248A	Wild	VN	M, Lc	+	2.94
G40250	Wild	VN	mM	+	2.39
G40251	Wild	VN	M, Lc	+	2.39
G40252	Wild	VN	M, Lc	+	2.02

G40253	Wild	VN	M, Lc	+	2.52
G40253A	Wild	VN	mM	+	2.57
G40254	Wild	VN	mM	+	2.28
G40255	Wild	VN	M, Lc	+	2.97
G40257	Wild	VN	mM	+	0.63
G40258	Wild	VN	M, Lc	+	3.6
G40258A	Wild	VN	SN	+	3.61
G40259	Wild	VN	dD	+	3.01
G40260	Wild	VN	mM	+	2.98
G40262	Wild	VN	SN, mM	+	3.13
G40265	Wild	VN	dD	+	2.62
G40269	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.8
G40270	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.62
G40271	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.62
G40272	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.65
G40273	Wild	NS	mM	+	3.63
G40274	Wild	VN	M, Lc	+	3.6
G40275	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.62
G40276	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.64
G40277	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.61
G40279	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.6
G40282	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.56
G40283	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.61
G40284	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.62
G40285	Wild	VN	M, Lc	+	3.4
G40286	Wild	VN	M, Lc	+	3.43
G40287	Wild	VN	NS	+	0.54
G40288	Wild	VN	mM	+	3.46
G40289	Wild	VN	NS	+	1.3
G40290	Wild	VN	M, Lc	+	3.61
G40291	Wild	VN	sM	+	3.45
G40294	Wild	NS	NS	+	3.39
G40295	Wild	VN	mM	+	3.59
G40296	Wild	VN	mM	+	3.21
G40298	Wild	NS	M, Lc	+	3.6
G40299	Cultivated	NS	mM	+	2.95
G40300	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.62
G40301	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.58
G40302	Wild	VN	M, Lc	+	3.46
G40303	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.5
G40304	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.6

MEX114	Cultivated	NS	M, Lc	+	2.79
Neb T-8a-S	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.44
PI 440792	Cultivated	VN	sM	+	3.44
PI 440793	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.53
PI 440795	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.45
PI 440798	Cultivated	NS	M, Lc	+	0.54
PI 440800	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.44
PI 440801	Cultivated	NS	sM	+	3.44
PI 440802	Cultivated	VN	sM	+	0.6
PI 440805	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.48
PI 440806	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.42
PI 458873	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.49
PI 458874	Cultivated	NS	M, Lc	+	1.88
PI 462026	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.47
PI 476858	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.84
PI 477033	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.43
PI 477035	Cultivated	VN	M, Lc	+	0.42
PI 477036	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.48
PI 477038	Cultivated	VN	M, Lc	+	0.5
PI 535224	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.48
PI 535227	Cultivated	NS	M	+	3.47
PI 535233	Cultivated	NS	mM	+	0.48
PI 549447	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.5
PI 638833	Wild	NS	M, Lc	+	3.5
PI 638925	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.49
PI 638926	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.47
PI 653254	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.68
TB1	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.51
TARS-Tep 23	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.46
TARS-Tep 29	Cultivated	NS	M, Lc	+	1.54
TARS-Tep 32	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.47
TL-53S	Cultivated	VN	M, Lc	+	3.5
W6 32480	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.42
W6 32481	Cultivated	NS	mM	+	0.48
W6 32483	Cultivated	VN	mM	+	1.23
W6 32485	Cultivated	NS	M, Lc	+	3.43
12IS-9800-1	TARS	NS	M, Lc	+	3.58
12IS-9800-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.61
12SH-9801-1	TARS	NS	M, Lc	+	3.60
12SH-9801-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.57
12SH-9803-1	TARS	NS	NS	-	0.07

12SH 9805-1	TARS	NS	M, Lc	+	2.07
12SH-9805-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.58
12SH-9806-1	TARS	NS	M, Lc	+	2.03
12SH-9807-1	TARS	NS	M, Lc	+	2.85
12SH-9807-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.57
12SH-9808-1	TARS	NS	M, Lc	+	3.59
12SH-9808-2	TARS	NS	M, Lc	+	1.45
12SH-9809-1	TARS	NS	M, Lc	+	1.77
12SH-9809-2	TARS	NS	M, Lc	+	0.85
12SH9811-1	TARS	NS	M, Lc	+	3.63
12SH-9810-1	TARS	NS	M, Lc	+	3.55
12SH-9811-2	TARS	NS	NS	+	1.13
12SH-9812-1	TARS	NS	NS	+	1.42
12SH-9812-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.23
12SH-9813-1	TARS	NS	NS	+	0.78
12SH-9813-2	TARS	NS	M, Lc	+	3.26

[ɤ]Genotipos: G, CIAT; PI, USDA Western Regional Plant Introduction Station; SH, USDA-ARS-TARS
[ɨ]Descripción de los síntomas: NS= no síntomas, SN= Necrosis Sistémica, VN= necrosis en las venas, NLL= lesiones necróticas localizadas, M= Mosaico, mM= mosaic leve, sM= mosaico severo, Lc= enrollamiento de la hoja, sD= muerte entre los 7-10 días después de la inoculación, dD= muerte después de los 10 días.
[Ω] categoría de susceptible o resistente calculados con base en la lectura del control negativo de cada plato (2×).

Líneas que fueron clasificadas como resistentes basado en la prueba de ELISA, no mostraron síntomas o produjeron necrosis en las venas de las hojas (Tabla 14). Combinaciones específicas de genes de resistencia al BCMV y BCMNV producen diferentes síntomas cuando plantas son inoculados con la cepa NL 3 D (Kelly, 1997). Un grupo de 12 genotipos , mostró consistentemente valores negativos para la prueba de ELISA y no síntomas fenotípicos de mosaico en los trifolios. G40085, G40099, G40171 y G40178 no mostraron ninguna reacción ni en las hojas primarias (área de la inoculación), ni en los trifolios, los cuatro son formas silvestres.

Tabla 14. Genotipo, estado biológico, lugar de recolección, respuesta fenotípica a la cepa de *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) NL3 en las hojas primaria y trifoliada, y

resultados de la prueba ELISA en 9 genotipos del panel de diversidad de tépari. Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015.

Genotipo[x]	Estado Biológico	Lugar de recolección	Respuesta a NL3[ł]			
			Hoja Primaria	Trifolio	ELISA	
G40085	Silvestre	Durango, México	NS	NS	-	0.08
G40099	Silvestre	Durango, México	NS	NS	-	0.07
G40171	Silvestre	Durango, México	NS	NS	-	0.11
G40178	Silvestre	Chihuahua, México	NS	NS	-	0.08
PI 440785	Cultivado	Durango, México	NS	NS	-	0.09
G40091	Silvestre	Durango, México	VN	NS	-	0.11
G40198	Silvestre	Texas, E.E. U.U.	VN	NS	-	0.02
G40212A	Silvestre	Arizona, E.E. U.U.	VN	NS	-	0.07
G40223	Silvestre	Arizona, E.E. U.U.	VN	NS	-	0.10
G40249	Silvestre	Chihuahua, México	VN	SN	-	0.07
G40256	Silvestre	Chihuahua, México	VN	SN	-	0.06
G40297	Silvestre	Sinaloa, México	VN	NS	-	0.09

[x]Genotipos: G, CIAT, PI, USDA Western Regional Plant Introduction Station

[ł]Descripción de los síntomas: NS, no síntomas, SN, Necrosis Sistémica, VN, necrosis en las venas

PI 440785, tuvo igualmente ausencia de síntomas, siendo la única accesión cultivada que presentó ausencia total de síntomas. Los cinco genotipos son provenientes de Durango, México. En el frijol común, dicha reacciones se atribuyen a la presencia de los genes de resistencia *I*, *bc-3* y *bc-u* (Kelly, 1997). Adicionalmente, fue deseable identificar accesiones provenientes de Durango, México, ya que se conoce que este tipo de resistencia en el frijol común es proveniente de la raza Durando (Morales, 2006).

G40091, G40198, G40212A y G40223 también mostraron ausencia de síntomas en los trifolios, pero mostraron necrosis en las venas de las hojas primarias, provenientes de Durando, México, Texas y Arizona (E.E. U.U.), siendo las cuatro formas silvestres. Los genotipos G40249, G40256

y G40297 mostraron necrosis en las venas del área inoculada y también necrosis que se extendió sistémicamente a los demás trifolios como lesiones necróticas localizadas. Éstos nueve genotipos fueron consistentes en mostrar en las evaluaciones valores negativos para la prueba de ELISA. Este tipo reacción en frijol común requiere la presencia de los genes de resistencia *bc-1*^{2}, *I* y *bc-u*.

Diferentes formas de necrosis fueron expresadas en las hojas primarias, asociadas con síntomas expresados con la inoculación de la cepa NL3 de BCMNV en el frijol común. Un grupo de genotipos mostró necrosis en las venas en el área de la hoja primaria inoculada (Figura 8.a.1, 8.b.1). Los genotipos G40001, G40041, G40042, G40044, G40078, G40177A2, G40177E, G40177E1 y G40269, al ser establecidos en 3 experimentos para confirmar la repetitividad de los síntomas, presentaron síntomas constantes. Estos genotipos presentaron síntomas de necrosis en el área infectada, concentrándose en las venas (síntoma clasificado como VN) como en los genotipos G40001, G400041 y G400042 y en otros casos lesiones que se extendieron en la lámina foliar (síntoma clasificado como NLL), como en el caso de los genotipos G40177E1.

La presencia de necrosis en el área de las venas de la parte inoculada y el resto de la planta sana, es asociada en el frijol común con la presencia del gen dominante *I*, protegido por el gen recesivo *bc–1*^{2} (Miklas *et al*., 1997). Genotipos como G40019, presentaron necrosis en el área inoculada, pero no presentaron síntomas en el resto de la planta, con valores de ELISA inconsistentemente negativos pero, considerado positivo a la prueba por la inconsistencia. En el frijol común, la respuesta al BCMNV es hipersensitiva, lo cual significa que aunque la planta tiene un mecanismo de resistencia, el virus puede persistir en la planta.

El genotipo G40091, mostró síntomas de necrosis en el área inoculada y ascendencia sistémica de los síntomas necróticos a los trifolios, se consideró positivo para la prueba ELISA ya que sus

valores fueron inconsistentes. Otros genotipos como G40078 mostraron una necrosis sistémica consistente (Figura 8.a.5, 8.b.5), pero que no tuvieron una muerte de la planta, sino que nuevos trifolios eran formados y la necrosis ascendía a nuevos trifolios conforme el crecimiento de la planta. Igualmente genotipos silvestres como G40177E1, mostraron necrosis sistémica, la cual tuvo variaciones entre los genotipos en términos del área de la hoja con lesiones. Genotipos con esta característica fueron positivos a la prueba de ELISA. En el frijol común, plantas inoculadas con la cepa NL3, que tienen la presencia del gen *I*, como es el caso de 'Verano', tienen valores negativos o más bajo que en el frijol tépari cuando se realiza la prueba de ELISA, pero considerando que el gen actúa como un mecanismo de reacción hipersensitiva en la planta, valores más altos en las pruebas de ELISA no necesariamente están reflejando la ausencia del gen.

Más de 100 de los genotipos evaluados presentó tipos de necrosis con características no típicas a las conocidas en el frijol común, siendo que era de menor tamaño, en algunos casos solo en el centro de la vena, y por su inconsistencia en los 3 experimentos, sugiriendo ser muy dependiente de las condiciones ambientales. En estos casos, se evaluó colocando plantas sanas del mismo genotipo simultáneamente, observándose siempre pequeña sintomatologías necróticas. Estos genotipos presentaron valores iguales al control susceptible en la prueba de ELISA. Sin embargo, se identificó este grupo con el síntoma necrótico en la hoja primaria (VN), en orden de poder diferenciarlo de los genotipos que no tuvieron ningún síntoma, adicionalmente fueron síntomas que pudieron observarse en el envés de la hoja.

La línea del programa de mejoramiento de tépari USDA-ARS-TARS, 12SH-9803-1, derivada del cruzamiento Tep 4 × PR1217-17, fue consistentemente negativa a la prueba de ELISA y mostró ausencia completa de síntomas después de la inoculación con NL-3. Otras líneas del programa de

mejoramiento, como 12SH 9809-2, mostraron síntomas muy leves de mosaico, pero cuando se evaluó un número mayor de plantas, los resultados fueron inconsistentes.

Para las evaluaciones de las líneas de tépari, podría considerarse que algunas de las inconsistencias en las primeras evaluaciones se deban a que la semilla utilizada para estas pruebas, podría estar segregando para éstas características, siendo que se realizó dichas pruebas con semillas provenientes de una colección y no de una planta individual auto fecundada. En el tercer experimento en 2015 las líneas fueron incrementos a partir de una planta individual.

Otra posibilidad podría ser que la ausencia de síntomas en algunas de ellas, fuese únicamente por falta de infección de las plantas que no presentaron síntomas, sin embargo es poco probable, puesto que en estos casos se repitió la inoculación en la misma planta y siempre se estableció un número considerable de controles que mostraran la eficiencia de la infección.

Los marcadores desarrollados para BCMV, BCMNV y BGYMV, fueron evaluados en estas accesiones, pero no son informativos para el frijol tépari.

Estos resultados ofrecen información para el mejoramiento de la característica de resistencia al BCMNV en el frijol tépari. El desarrollo de poblaciones biparentales, en las que se cuente con un menor número de genes y patrones de segregación puedan ser estudiados, puede permitir confirmar la presencia de genes de resistencia.

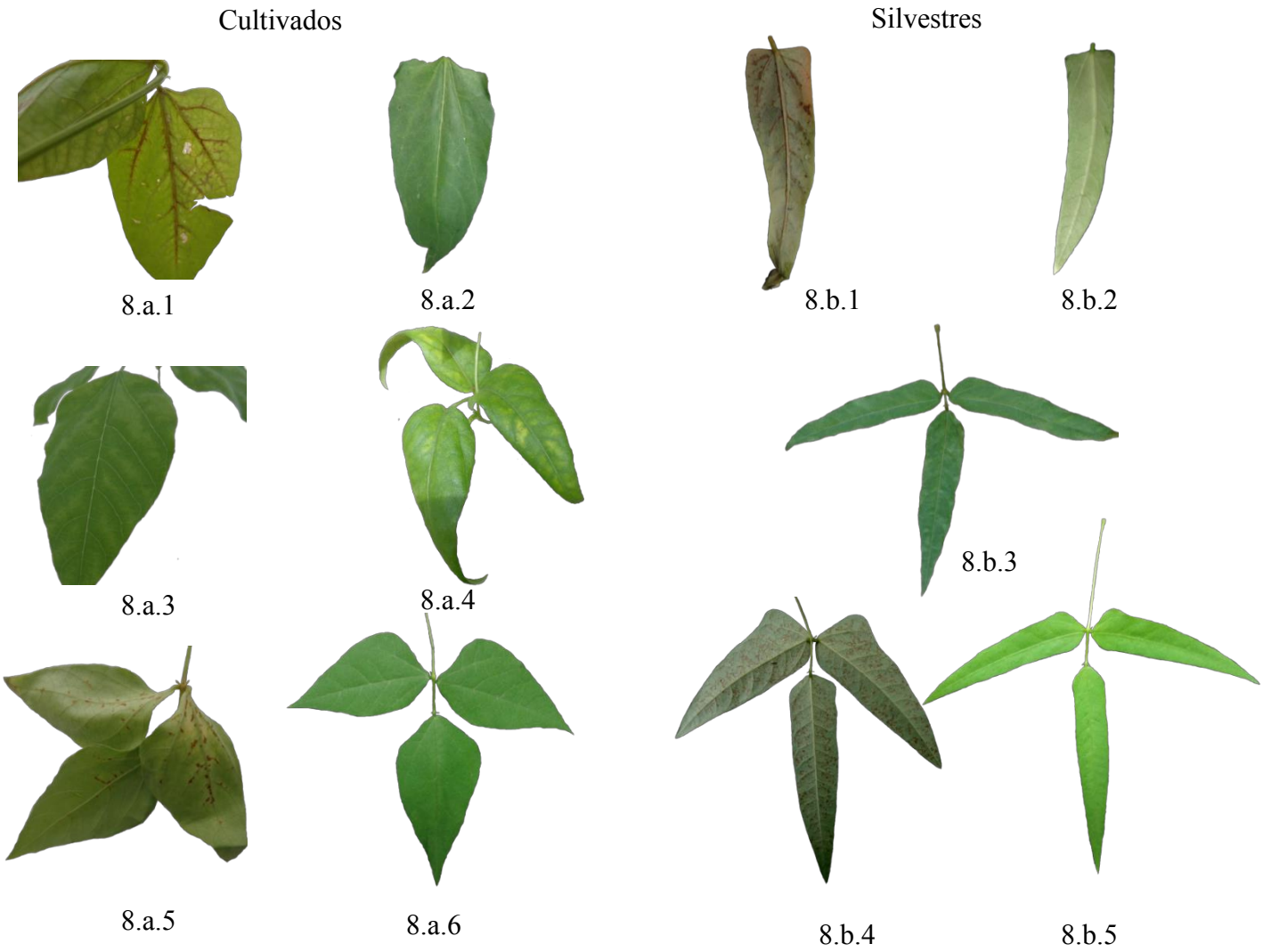


Figura 8. Reacción fenotípica de genotipos de cultivados y silvestres de tépari, a la inoculación con la cepa NL3 de BCMNV. 8.a.1 y 8.b.1= necrosis en hojas primarias, 8.a.2 y 8.b.2= no síntomas en hojas primarias, 8.a.3 y 8.b.3= mosaico, 8.a.4= enrollamiento de hoja, 8.a.5 y 8.b.5= lesiones necróticas en hojas trifoliadas, 8.a.6 y 8.b.6= no síntomas en hojas trifoliadas.

VI-REFERENCIAS

Aguilar, M., Riva, O., Peltzer, E. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proccedings of the National Academic of Sciences of USA 101(37) 13548-13553.

Althabegoiti, M.J., Ormeño-Orrillo, E., Lozano, L., Torres Tejerizo, G., Rogel, M.A., Mora, J., Martínez-Romero, E. 2014. Characterization of *Rhizobium grahamii* extrachromosomal replicons and their transfer among rhizobia. BMC Microbiology 14:6.

Alves, B.J.R., Boddey, R.M., Urquiaga, S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. Plant and Soil 252:1-9.

Beaver, J.S., Prophete, E.H., Rosas, J.C., Godoy-Lutz, G., Steadman, T.G., Porch Clay, T.G. 2014. Release of 'XRAV-40-4' black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 98:83-87.

Beaver, J.S., Rosas, J.C., Myers, Acosta, J.D., Kelly, N. Nchimbi-Msolla, Misangu, R., Bokosi, J., Temple, S., Arnaud-Santana, E., Coyne, D.P. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to cultivar and germplasm development in common bean. Field Crops Research 82:87-102.

Beebe, S.E., Rao, I.M., Blair, M.W., Acosta-Gallegos, J.A. 2013. Phenotyping common bean for adaptation to drought. Frontiers in Plant Physiology 4(35): 1-20.

Bhardwaj, H. 2013. Preliminary evaluation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) as a forage crop. Journal of Agricultural Science 5(7):1916-9752.

Blair, M.W., Bassett, M.J., Abouzid, A.M., Hiebert, E., Polston, R.T., McMillan, W., Graves, Lamberts, M. 1995. Ocurrence of bean golden mosaic virus in Florida. Plant Disease 79:529-533.

Blair, M.W. and Beaver, J.S. 1993. Inheritance of bean goldem mosaic resistance from genotype A 429. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 36:143.

Butare, L., Rao, I.M., Lepoivre, P., Polania, J., Cajiao, C., Cuasquer, J., Beebe, S. 2011. New genetic sources of resistance in the genus *Phaseolus* to individual and combined aluminium toxicity and progressive soil drying stresses. Euphytica 181: 385-404.

Cuadrado, B., Rubro, G., Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionadas de los cultivos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinoculantes. Revista de Ciencia Química y Farmacia 31(1):78-104.

Delamuta, J.M.R., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E. Hungría, M. 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology 63:3342-3351.

Dénarié, J., Debellé, F., Promé, J.C. 1996. *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules madiating recognition and morphogenesis. Annual Review of Biochemestry 65: 503-535.

Díaz-Alcántara, C.A., Ramírez-Bahena, M.H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., Velásquez, E., González-Andrés, F. 2013. Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. Systematic and Applied Microbiology 37(2):149-56.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar

Downie, J.A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. In: Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J. (eds), The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 387-402.

Drijfhout, E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Agricultural Research Report. Centre Agric. Publ. Doc. Wageningen.

ERS. 2012. U.S. Drought 2012: Farm and Food Impacts. Retrieved December 12, 2014. http://www.ers.usda.gov/topics/in-the-news/us-drought-2012-farm-and-food-impacts.aspx#crop

Esseling, J.J., Lhuissier, F.G., Emons, A.M. 2003. Nod factor-induced root hair curling: continuos polar growth towards the point of nod factor application. Plant Physiology 132: 1982-1988.

Estevez de Jensen, C. 1991. Nitrogen fixation and drought tolerance in interespecific *Phaseolus* hybrids. Master Science Thesis. University of Minnesota. 104p.

Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M. 1991. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. Planta 209:207-212.

Ferwerda, F.H, Bassett M.J., Beaver, J. 2003. Viability of seed of reciprocal interspecific crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutilofius* A. Gray. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 46:29-30.

Freiberg, F., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosental, A., Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature (London) 387:394-401.

Gálvez, G.E., Morales, F.J. 1989. Aphid-transmitted viruses. P. 333-362. In H.F. Schwartz and M.A. Pastor Corrales (eds.). Bean production problems in the tropics. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia."

García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F.,Velázquez, E. 2010. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nod*C alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. Canadian Journal of Microbiology 56: 657–666.

Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., Young, J.P.W. 2001. Phylogenies of *atp*D and *rec*A support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:2037-2048.

Geurts, R., Fedovora, E., Bisseling, T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. Plant Biology 8:346-352.

Gillett, J.M, Morrissey, Susan, M, Ramsdell, D.C. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive –negative threshold. Plant Disease 8(70): 722-726.

Giller, K. 2002. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems (2nd Edition). Book review. Soil Biology and Biochemistry 34:1969-1970.

González, J.E., Reuhs, B.L. 1996. Low molecular weight EPSIIof *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Ptoceedings of the National Academic of Sciences 93: 8636-8641.

Graham, P.H., Draeger, K.J. Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., Aaron, S.R. Quinto, C. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyhizobium*, and initial studies on the bassis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. Canadian Journal of Microbiology 40:198-207.

Grogan, R.G. y Walker, J.C. 1948. The relation of common mosaic to black root of bean. Journal of Agricultural Research. Washington 77:315-331.

Hassan, S., Mathesius, U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plan-microbe interactions. Journal of Experimental Botany 63:3429-3444.

Haukka, K., Lindström, K, Young, J.P.W. 1998. Three phylogenetic groups of *nod*A and *nif*H genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. Applied and Environmental Microbiology 64: 419-426.

Herridge, D., Peoples, M.B., Boddey, R. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil 311: 1-18.

Hungría, M., Campo, R.J., Barcellos, F.G., Chueire, L.M., Menna, P., Batista, J., Pinto, F.G., Binde, D.R., Godoy, L.P., Pereira, A.A. 2008. Biological nitrogen fixation with the soybean and common bean crops in the tropics. In Dakota, F.D. *et al*. (eds) Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. Springer Sciences + Business Media B.V., pp 33-34.

Hungría, M., Franchini, J.C., Campo, R.J., Crispino, C.C., Moraes, J.Z., Sibaldelli, R.N.R., Mendes, I.C., Arihara, J. 2006. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N_2 fixation and N fertilizer to gran yield. Canadian Journal of Plant Science 86: 927-939.

Hungría, M., Campo, R.J., Carvalho Mendes, I. 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobim tropici* strains. Biology and Fertility of Soils 39: 88-93.

Hungría, M., Vargas M.A.T. 2000. Enviromental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Fields Crops Research 65: 151-164.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* genus nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology 32:136-139.

Jury, W.A., Vaux, H.J. 2007. The emerging global water crisis: Managing scarcity and conflict between water uses. Advances in Agronomy 95: 1-76.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Research 7:331-338.

Kelly, J.D. 1997. A review of varietal response to bean common mosaic potyvirus in *Phaseolus vulgaris*. Plant Varieties and Seeds 10: 1-6.

Kelly, J.D., Afanador, L., Haley, S.D. 1995. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. Euphytica 82: 207-212.

Kusolwa, P.M., Myers, J. 1999. Interspecific hybridation between *P. vulgaris* and *P. acutifolius* to transfer bruchid resistance. Department of Horticulture, Oregon State University, Corvallis, OR, 97331. 2 p.

Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E. 1993. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. Canadian Journal of Microbiology 38:501-505.

Laguerre, G., Nour, S., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouind, P., Amarger, N. 2001. Classification of rhizobia based on *nod*C and *nif*H gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology 147:981-993.

Lin, T.Y. and Markhart, A.H. III 1996. *Phaseolus acutifolius* A. Gray is more heat tolerant than *P. vulgaris* L. in the absence of water stress. Crop Sciences 36: 110-114.

Mapp, C. D. (2008). Nodulation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) upon inoculation with a commercial inoculant (*Phaseolus* spec #3). MS Thesis, Virginia State University, Petersburg, VA 23806.

Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:489-503.

Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and Leucaena sp. trees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 41:417–426.

Mejía-Jiménez, A., Muñoz, C., Jacobsen, H.J., Roca, W.M., Singh, S.P. 1994. Interspecific hybridization between common and tepary beans: increased hybrid embryo growth, fertility, and efficiency of hybridization through recurrent and congruity backcrossing. Theoretical and Applied Genetics. 88:324-331.

Menna, P., Gomes Barcellos, F., Hungría, M. 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS regin and *gln*ll, *rec*A, *atp*D and *dna*K genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:2934-2950.

Miklas, P.N., Rosas, J.C., Beaver, J.S., Telek, L., Freytag, G.F. 1994. Field performance of select tepary bean germplasm in the tropics. Crop Science 34: 1639-1644.

Mohamed, M.F., Schmitw-Eiberger, N., Keutgen, N., Noga, G. 2005. Comparative drought postponing and tolerance potentials of two tepary lines in relation to seed yield. African Crop Science Journal 13: 49-60.

Mohrmann, M. D. (2011). Plant-microbe interaction between tepary bean and *Bradyrhizobium* strains. MS Thesis, Virginia State University, Petersburg, VA 23806.

Morales, F.J. 2006. G. Loebenstein y J.P. Carr (eds). Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses, 367-382.

Morales, F.J., Niessen, A.I. 1988. Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. Plant Disease 72: 1020-1023.

Muñoz, L.C., Blair, M.W., Duque, M.C., Tohme, J. 2004. Introgression in common bean × tepary bean interspecific congruity-backcross lines as measured by AFLP markers. Crop Sciences 44:637-645.

Nishi, C.M.Y., Boddey, L.H., Vargas, M.A.T., Hungría, M. 1996. Efeito da reinoculacao na soja [Glycine max (L.) Merrill] em um solo com populacao estabelecida de *Bradyrhizobium* com as extirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. Pesquisa Agropecuaria Brasil 31:359-368.

Olivares, J., Bedmar, E.J., Sanjuán, J. 2013. Biological Nitrogen Fixation in the context of global change. Molecular Plant-Microbe Interactions 26(5) 486-494.

Oliveira, J.P., Galli-Terasawa, L.V., Gli Enke, C., Kava Cordeiro, V., Tavares Armstrong, L.C., Hungría, M. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean. Wolrd Journal of Microbiology and Biotechnology 27(3):643-650.

Ormeño-Orrillo, E. Servin-Garciduenas, L., Imperial, J., Rey, L., Ruiz-Argueso, T., Martínez-Romero. E. 2013. Phylogenetic evidence of the transfer of *nod*Z and *nod*L genes from *Bradyrhizobium* to other *rhizobia*. Molecular Phylogenetics and Evolution 67:626-630.

Parker, J.P., Michaels, T.E. 1986. Simple genetic control of hybrid plant development in interspecific crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Breeding 97: 315-323.

Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K., and Müller, P. 1994. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective exoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 7:631-638.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology 64:180-201.

Pierce, W.H. 1935. The inherence of resistance to common bean mosaic in field and garden beans. Phytopathology 25:875-883.

Porch, T.G., Beaver, J.S., Brick, M.A. 2013. Registration of tepary germplasm with multiple-stress tolerance, TARS-Tep 22 and TARS-Tep 32. Journal of Plant Registrations 7:358-364.

Porch, T.G., Beaver, J.S., Debouck, D.G., Jackson, S., Kelly, J.D., Dempewolf, H. 2013. Use of wild relatives and closely-related species to adapt common bean to climate change. Agronomy 3:433-461.

Poupot, R., Martínez-Romero, E., Gautier, N., Promé, J.C. 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. The Journal of Biologiccal Chemistry 270:6050-6055.

Pueppke, S.G., Broughton, W.J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Molecular Plant-Microbe Interactions 12:293-318.

Prophete, E., Demosthene, G., Godoy, L., Porch Clay, T.G., Beaver, J.S. 2014. Registration of PR0633-10 and PR0737-1 red mottled dry bean germplasm lines with resistance to BGYMV, BCMV, BCMNV, and common bacterial blight. Journal of Plant Registrations 8:49-52.

Provvidenti, R. y Cobb, E.D. 1975. Seed transmission of common bean mosaic virus in tepary bean. Plant Disease 59(12):966-969.

Rabakoarihanta, A., Shii, C.T., Mok, M.C., Mok, D.W.S. 1980. Meiosis and fertility of interspecific hybrids between *P. vulgaris* and *P. acutifolius* A. Gray. Theorical and Applied Genetics 57: 59-64.

Rainey, K.M. and Griffiths, P.D. 2005. Evaluation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray plant introductions under high temperatures in a controlled enviroment. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 117-120.

Rao, I, Beebe, S, Polania, J, Ricaurte, J, Cajiao, C, García, R, Rivera, M. 2013. Can tepary be a model for improvement of drought resistance in common bean? African Crop Science Journal 4(21): 265-281.

Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. 2011. Symbiovars in rhizobia refelct bacterial adaptation to legumes. Systematic and Applied Microbiology 34: 96-104.

Rosas, J.C., Beaver, J.S., Beebe, S. y Viana, A. 2004. Nomenclatura de variedades de frijol común liberadas en centro América y el Caribe. Agronomía Mesoamericana 15(2):221-224.

Rosas, J.C. 2003. El cultivo del frijol común en América Tropical. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 56 p.

Rosas J.C., Castro, J.A., Robleto, E.A., Handelsman, J. 1998. A method for screening *Phaseolus vulgaris* L. germplasm for preferencial nodulation with a selected *Rhizobium etli* strain. Plant and Soil 203: 71-78.

Segovia, L., Young, J.P.W., Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli*. International Journal of Systematic Bacteriology 43:374-377.

Shisanya, C.A. 2003. Yield and Nitrogen Fixation Response by Drought Tolerant Tepary Bean (Phaseolus acutifolius A. Gray Var. latifolius) in sole and Maize Intercrop Systems in Semi-arid Kenya. Pakistan Journal of Agronomy 2(3): 126-137.

Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag New York Inc. 450p.

Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1991. Symbiotic Interaction of *Phaseolus acutifolius* and *Phaseolus acutifolius* × *Phaseolus vulgaris* hybrid progeny symbiosis with *Bradyrhizobium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Canadian Journal of Microbiology 37:497-503.

Smil, V. 1999. Nitrogen in crop production: an account of global flows. Global Biogeochemical Cycles 13: 647-662.

Spaink, H.P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology 54:257-288.

Stepkowski, T., Moulin, T., Krzyanska, A., Mclnnes, A., Law, I.J., Howieson, J. 2005. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. Applied and Environmental Microbiology 71:7041-7052.

Van Berkum, P, Elia, P., Song, Q, Bertrand, D.E. 2012. Development and application of a Multilocus Sequence Analysis method fot the identification of Genotypes within genus *Bradyrhizobium* and for establishing nodule occupancy of soyben (*Glycine max* L. Merr). Molecular Plant-Microbe Interactions 3(25): 321-330.

Vlassak, K., Vanderleyden, J., Franco, A. 1996. Competition and persistance of *Rhizobium tropici and Rhizobium etli* soil during succesive bean (*Phaseolus vulgaris* L) cultures. Tropical Soil Biology and Fertility 21: 61-68.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 195 p.

Wang, T., Martínez-Romero, J., López-Lara, I. 2005. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. 16 p.

Wernegreen, J.J., Riley, M.A. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. Molecular Biology and Evolution. 16:98-113.

Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H. 1995 *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. International Journal of systematic Bacteriology 45:706-711.

Young, J.P.W. 1998. Bacterial evolution and the nature of species. In Advances in Molecular Ecology. Edited by G.R. Carvalho. Amsterdam: IOS Press. pp. 119-131

Young, J.P.W., Haukka, K.E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytologist 133: 87-94.

VII-APÉNDICES

Apéndice 1. Características morfológicas de aislados de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* cultivados en medios YMA, YMA+CR, YMA+BB.

Cepa	Forma	Color	Textura/Apariencia	CR	BB	DPC
USDA 3	plana	blanco/translúcido	gomoso/suave	rosado	alcalino	3 mm
USDA 73	abovedada	blanco	gomoso/firme	no absorbe	alcalino	2 mm
USDA 76	plana	blanco	suave/brillante	rosado	alcalino	3 mm
USDA 94	cónica	blanco/translúcido	poco densa/gomosa/brillante	absorbe	alcalino	1 mm
USDA110	cónica	blanco opaco/puntos rojos	poco densa/gomosa/brillante	rosado	alcalino	1 mm
USDA 122	cónica	blanco opaco/puntos rojos	firme/poco gomosa	rosado	alcalino	1 mm
USDA 123	abovedada	blanco	firme/poco gomosa	no absorbe	alcalino	1 mm
USDA 3254	abovedada	blanco	densa/gomoso/brillante	no absorbe	alcalino	3 mm
EAP 1001	cónica	blanco opaco/puntos rojos	poco densa/poco gomosa	rosado	alcalino	1 mm
EAPBAN	abovedada	blanco/translúcido	gomosa/brillante	rosado	alcalino	3 mm
UPR 2010	abovedada	translúcido	gomosa/brillante	rosado	alcalino	2 mm
COROZAL	abovedada	blanco/translúcido	poco densa/brillante	rosado	alcalino	3 mm
JUANA DIAZ	plana	blanco opaco	suave/poco gomosa	no absorbe	ácido	3 mm
ISABELA	plana	blanco	suave/poco gomosa	rosado	alcalino	1 mm
CIAT 899	abovedada	translúcido	suave/brillante	rosado	ácido	5 mm

CIAT 632	abovedada	translúcido	suave/brillante	rosado	ácido	5 mm
CR 477	abovedada	translúcido	suave/brillante	rosado	ácido	4 mm

CR=Rojo Congo, BB=Azul de Bromotimol, DPC=diámetro promedio de la colonia (mm).

Apéndice 2. Resultados del análisis de suelo en el campo, sub Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Isabela, 2014.

Identificación€		Valor
pH		5.1
Conductividad	µS/cm	252.1
% Materia Orgánica		2.38
Fósforo disponible	mgP-PO4/Kg	16
Calcio	mgCa/Kg	503
Magnesio	mgMg/Kg	91
Potasio	mgK/Kg	124
Sodio	mgNa/Kg	96
Aluminio	mgAl/Kg	18
CICE	meq/100g	4

CICE: Capacidad de intercambio cationico equivalente.
€ Muestra analizada en la Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Juana Díaz, bajo el código S-14-0663.

Apéndice 3. Genotipos del panel de diversidad de tépari incluidos en las evaluaciones de BCMNV. Mayagüez, Puerto Rico, 2013-2015.

Genotipo	Peso 100 semillas (g)	País de Origen	Región	Genotipo	Peso 100 semillas (g)	País de Origen	Región
G40001	16.1	México	Veracruz	G40046	4.6	México	Sonora
G40006B	15.2	México	Chiapas	G40047	4.2	México	Sonora
G40008	16.8	Morocco		G40048	3.2	México	Sonora
G40009	16	El Salvador	Santa Ana	G40049	4.3	México	Sonora
G40010	14.5	El Salvador	San Miguel	G40050	3.8	México	Sonora
G40012	14.2	Nicaragua	Chinandega	G40051	3.8	México	Sonora
G40013A	14.3	Nicaragua	Rivas	G40052	3.2	México	Durango
G40013D	14.8	Nicaragua	Rivas	G40053	3.4	México	Sonora
G40018	14.7	México	Chiapas	G40054	5.1	México	Sonora
G40019	11.1	México	Oaxaca	G40055	6.8	México	Sinaloa

G40020	13.9	México	Sonora	G40056	6.2	México	Sonora
G40021	13.8	México	Jalisco	G40057	16.9		
G40022	15.3	E.E. U.U.	Arizona	G40058	12.7	El Salvador	San Miguel
G40022A	16.2	E.E. U.U.	Arizona	G40059	12.8	El Salvador	Santa Ana
G40023	15.8	E.E. U.U.	Arizona	G40060	13.8		
G40025	18.4	E.E. U.U.	Arizona	G40061	13.3	El Salvador	Sonsonate
G40028	14.8	E.E. U.U.		G40062	12.6	Nicaragua	
G40029	16.7	E.E. U.U.		G40066A	15.9	E.E. U.U.	Arizona
G40030	18.2	E.E. U.U.	Arizona	G40067	17.6	E.E. U.U.	Arizona
G40032	15.2	Guatemala	Zacapa	G40068	18	E.E. U.U.	Arizona
G40034	14.9	México	Nayarit	G40071	2.6	E.E. U.U.	Arizona
G40035	10.5	México	Oaxaca	G40072	2.5	E.E. U.U.	Arizona
G40036	12	México	Oaxaca	G40073	4.2	México	Sonora
G40037	16.8	E.E. U.U.	Arizona	G40074	6	México	Sonora
G40037A	17.5	E.E. U.U.	Arizona	G40075	3.6	E.E. U.U.	N. México
G40038	14.2	México	Sonora	G40076	2.9	E.E. U.U.	N. México
G40039	13.7	México	Chiapas	G40077	2	E.E. U.U.	Texas
G40040	17.4	E.E. U.U.	Arizona	G40078	1.9	E.E. U.U.	Texas
G40041	15.5	Suráfrica		G40080	5.6	México	Sinaloa
G40042	20.6	E.E. U.U.	Nebraska	G40081	2.3	México	Durango
G40043	15.4	Nicaragua		G40082	3.8	México	Chihuahua
Mex114				G40083	4.3	México	Durango
G40045	5.5	México	Sonora	G40085	4	México	Durango
G40086	3.6	México	Durango	G40129	13.4	México	Sinaloa
G40087	4.2	México	Durango	G40130	12.6	México	Sinaloa
G40088	2.6	México	Durango	G40138	13	México	Sinaloa
G40089	4.4	México	Durango	G40140	13.7	México	Sinaloa
G40091	2.4	México	Durango	G40141	13.5	México	Sinaloa
G40092	2.7	México	Durango	G40142	16.8	México	Sonora
G40093	3.8	México	Durango	G40142A	15.2	México	Sonora
G40094	3.7	México	Durango	G40143	13.4	México	Sonora
G40095	3.6	México	Durango	G40144	13.2	México	Sonora
G40096	3.7	México	Durango	G40144A	15.2	México	Sonora

G40097	2.4	México	Durango	G40144B	16.3	México	Sonora
G40098	4.2	México	Durango	G40144C	13.7	México	Sonora
G40099	2.5	México	Durango	G40145	13.8	México	Sonora
G40100	4.8	México	Durango	G40146	14.4	México	Sonora
G40101	4.6	México	Durango	G40147	14.6	México	Sonora
G40103	4	México	Sinaloa	G40148	16.4	México	Sonora
G40104	4.3	México	Jalisco	G40149	13.4	México	Sonora
G40105	3.8	México	Jalisco	G40150	13.6	México	Sonora
G40106	6.3	México	Jalisco	G40151	14.3	México	Sonora
G40107	4.2	México	Jalisco	G40152	15.1	México	Sonora
G40108	3.2	México	Durango	G40153	16.6	México	Sonora
G40110	15	México	Campeche	G40154	14.9	México	Sonora
G40111	16.3	México	Campeche	G40156	17	México	Sonora
G40112	16.1	México	Durango	G40157	15.5	México	Sonora
G40113	2.4	E.E. U.U.	Arizona	G40158A	16.8	México	Sonora
G40114	2.8	E.E. U.U.	Arizona	G40159	16.4	México	Sonora
G40115	3	E.E. U.U.	Arizona	G40160	16.4	México	Sonora
G40116	7.4	México	Sonora	G40161	16.2	México	Sonora
G40117	2.3	E.E. U.U.		G40162	15.8	México	Sonora
G40117A	1.8	E.E. U.U.		G40163	14.1	México	Sonora
G40119	14.2	México	Oaxaca	G40164	14.7	México	Sonora
G40120	15.8	México	Sinaloa	G40165	14.5	México	Sonora
G40122	17.8	Zambia	Provincia E.	G40166	14.3	México	Sonora
G40125	16.3	México	Sinaloa	G40168	6	México	Sinaloa
G40127	13.9	México	Sinaloa	G40169	4.8	E.E. U.U.	Arizona
G40128	13.7	México	Sinaloa	G40171	3.4	México	Durango
G40172	17	E.E. U.U.	Arizona	G40198	4.3	E.E. U.U.	Texas
G40173	15	México	Sonora	G40199	4.4	México	Zacatecas
G40173A	19.3	México	Sonora	G40200	14.5	Costa Rica	Guanacaste
G40173B	16.5	México	Sonora	G40201	13.9	Costa Rica	Guanacaste
G40173C	16.1	México	Sonora	G40202	2.9	México	Durango
G40174	15.6	México	Sonora	G40203	3.7	México	Sonora
G40175	18.6	E.E. U.U.	Arizona	G40204	2	E.E. U.U.	Arizona

G40176	16.4	E.E. U.U.	Arizona	G40205	2.1	E.E. U.U.	Arizona
G40177A	8.6	E.E. U.U.	Arizona	G40206	4.4	México	Durango
G40177A1	10.5	E.E. U.U.	Arizona	G40207	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40177A2	9.8	E.E. U.U.	Arizona	G40208	1.9	E.E. U.U.	Arizona
G40177B1	10.1	E.E. U.U.	Arizona	G40209	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40177C	8	E.E. U.U.	Arizona	G40210	1.8	E.E. U.U.	Arizona
G40177D	9	E.E. U.U.	Arizona	G40210A	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40177E	8.2	E.E. U.U.	Arizona	G40211	1.9	E.E. U.U.	Arizona
G40177E1	6	E.E. U.U.	Arizona	G40212	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40177E2	12.5	E.E. U.U.	Arizona	G40212A	2	E.E. U.U.	Arizona
G40177E3	4.8	E.E. U.U.	Arizona	G40213	1.9	E.E. U.U.	Arizona
G40177F	9	E.E. U.U.	Arizona	G40213A	2.4	E.E. U.U.	Arizona
G40177G	10.7	E.E. U.U.	Arizona	G40214	2	E.E. U.U.	Arizona
G40178	2.7	México	Chihuahua	G40215	2	E.E. U.U.	Arizona
G40179	2.8	E.E. U.U.	Arizona	G40216	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40180	2	E.E. U.U.	Arizona	G40217	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40181	2.9	E.E. U.U.	Arizona	G40218	2.2	E.E. U.U.	Arizona
G40187	2.4	México	Michoacán	G40219	2.4	E.E. U.U.	Arizona
G40188	3.5	México	Michoacán	G40220	2.8	E.E. U.U.	Arizona
G40189	3.3	México	Michoacán	G40221	2.2	E.E. U.U.	Arizona
G40190	3.2	E.E. U.U.	N. México	G40222	2.5	E.E. U.U.	Arizona
G40191	2.8	E.E. U.U.	N. México	G40223	2.2	E.E. U.U.	Arizona
G40192	6.2	México	Sonora	G40224	1.7	E.E. U.U.	Arizona
G40193	1.8	E.E. U.U.	Arizona	G40225	3.1	E.E. U.U.	Arizona
G40194	6.4	México		G40226	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40195A	2.8	E.E. U.U.	Texas	G40227	3	E.E. U.U.	Arizona
G40195B	2.4	E.E. U.U.	Texas	G40228	2.3	E.E. U.U.	Arizona
G40196	4.3	E.E. U.U.	Texas	G40229	14	E.E. U.U.	Arizona
G40197	3.6	E.E. U.U.	Texas	G40230	16.3	E.E. U.U.	Arizona
G40231	1.7	E.E. U.U.	Arizona	G40265	4.4	México	
G40231A	1.9	E.E. U.U.	Arizona	G40269	15.5	México	Chiapas
G40232	15.9	México	Chiapas	G40270	15.9	México	Chiapas
G40233	2.2	E.E. U.U.	Arizona	G40271	19	México	Chiapas

G40234	21.6	E.E. U.U.	Wyoming	G40272	15.5	México	Sonora
G40235	3.2			G40273	2.2	México	Chihuahua
G40236	2.1	México	Durango	G40274	5.4	México	B. California
G40237	17.1	México	Coahuila	G40275	15	México	Sonora
G40237A	16	México	Coahuila	G40276	14.4	México	Sonora
G40238	16.2	México	Coahuila	G40277	15.2	México	Sonora
G40239	2.2	México	Durango	G40279	15.2	México	Sonora
G40242	2.1	México	Durango	G40282	18.2	E.E. U.U.	Arizona
G40243	1.6	México	Durango	G40283	16.2	E.E. U.U.	Arizona
G40244	3.2	México	Zacatecas	G40284	27.2	E.E. U.U.	Arizona
G40245	2.6	México	Michoacán	G40285	2.7	México	Veracruz
G40246	2.4	E.E. U.U.	N. México	G40286	4.8	E.E. U.U.	Arizona
G40247	3.3	México	Chihuahua	G40287	5.6	México	Sonora
G40248	2.2	México	Chihuahua	G40288	5.9	México	Sonora
G40248A	5.8	México	Chihuahua	G40289	3	México	Sonora
G40249	2.1	México	Chihuahua	G40290	3.7	México	Sinaloa
G40250	2.8	México	Chihuahua	G40291	4.5	México	Sinaloa
G40251	2.1	México	Chihuahua	G40294	4.6	México	Sinaloa
G40252	2.2	México	Chihuahua	G40295	4.1	México	Sinaloa
G40253	1.9	México	Chihuahua	G40296	6	México	Sinaloa
G40253A	2.2	México	Chihuahua	G40297	5.2	México	Sinaloa
G40254	2.3	México	Chihuahua	G40298	4	México	Guerrero
G40255	2.3	México	Chihuahua	G40299	12.6	Guatemala	Guatemala
G40256	2.3	México	Chihuahua	G40300	13.2	El Salvador	Santa Ana
G40257	2.2	México		G40301	10.9	Zimbabwe	Manicaland
G40258	2.8	México		G40302	9.2	Zimbabwe	Mashonaland
G40258A	2.8	México		G40303	13.9	Nicaragua	Rivas
G40259	1.7	México		G40304	17.2	E.E. U.U.	
G40260	2.1	México		PI 440785		México	Sonora
Neb T-6-S				PI 440792		México	Sonora
G40262	3	México		PI 440793		México	Sonora
Tep 29		Puerto Rico		PI 440798		E.E. U.U.	Arizona
PI 440800		E.E. U.U.	Arizona				

PI 440801	E.E. U.U.	Arizona
PI 440802	E.E. U.U.	Arizona
PI 440805	E.E. U.U.	Arizona
PI 440806	E.E. U.U.	Arizona
PI 458873	E.E. U.U.	Maryland
PI 458874	E.E. U.U.	Puerto Rico
PI 462026	E.E. U.U.	Arizona
PI 476858	México	Sonora
PI 477033	E.E. U.U.	Arizona
PI 477035	E.E. U.U.	Arizona
PI 477036	E.E. U.U.	Arizona
PI 477038	E.E. U.U.	Arizona
PI 440795	México	Sonora
PI 527335	E.E. U.U.	Arizona
PI 535224	E.E. U.U.	Puerto Rico
PI 535227	E.E. U.U.	Puerto Rico
PI 535233	E.E. U.U.	Puerto Rico
PI 549447	México	
PI 638833	México	
PI 653254	E.E. U.U.	N. México
PI 638925	E.E. U.U.	Washington
PI 638926	E.E. U.U.	Washington
W6 32480	E.E. U.U.	Nebraska
W6 32481	E.E. U.U.	Nebraska
W6 32483	E.E. U.U.	Nebraska
W6 32485	E.E. U.U.	Nebraska
Neb-T-8a-S		
Neb-T-15-S		
Tep 23		
TARS-Tep 32		
TB 1		

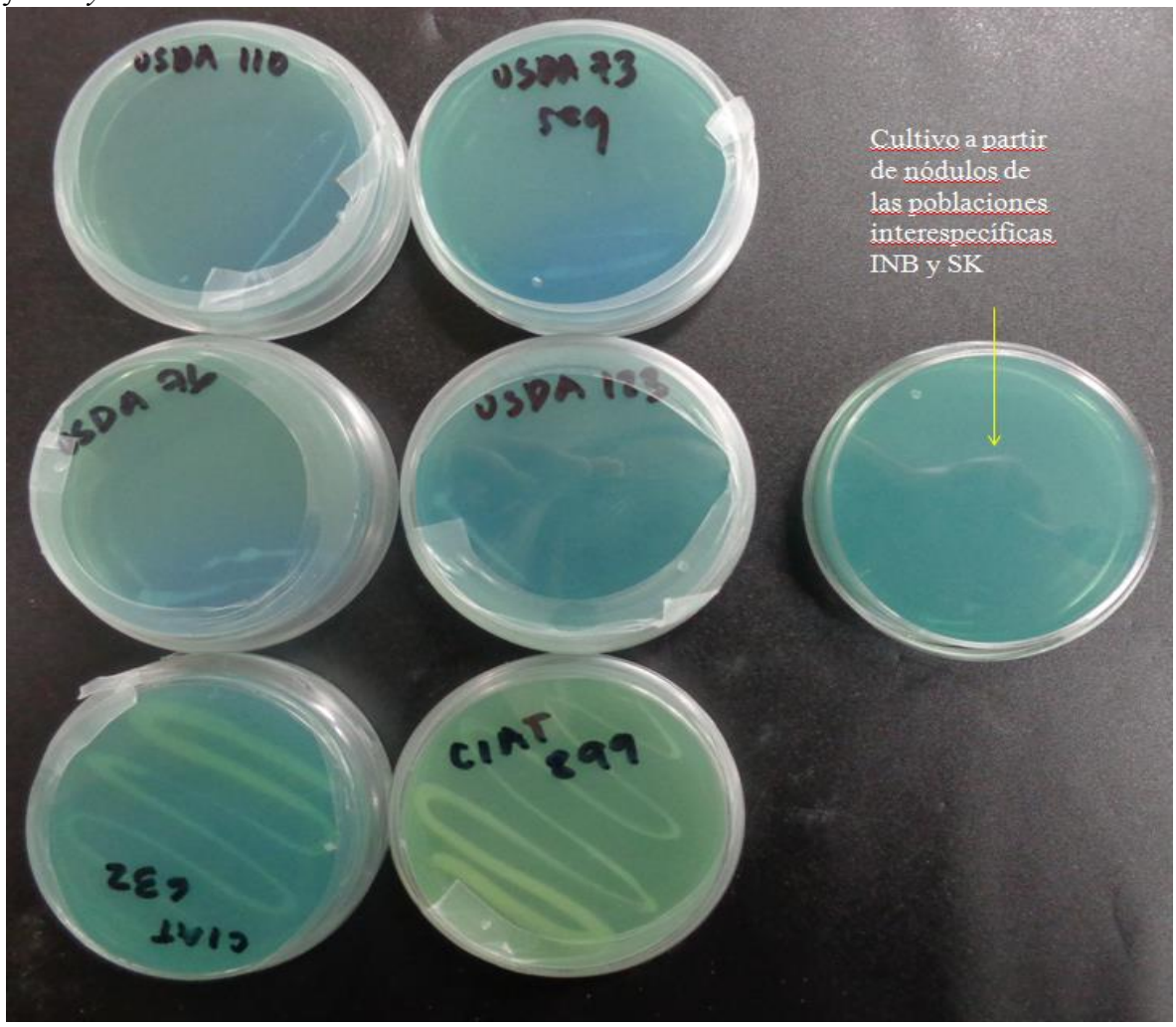
Apéndice 4: Resultado de los marcadores SW13, SAP6, SU91, PveIF4E^2, SR2, SW12 de 68 líneas interespecíficas INB.

Línea	Marcadores					
	SW13 *I, Pse-3* BCMV	SAP6 QTL CBB	SU91 QTL CBB	PveIF4E^2 *bc-3* BCMV	SR2 *bgm-I* BGMV	SW12 QTL BGMV
INB 806	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 807	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 808	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 809	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 810	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 811	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 812	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 813	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 814	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 815	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 816	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 817	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 818	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 819	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 820	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 821	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 822	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 823	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 824	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 825	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 826	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 827	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 828	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 829	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 830	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 831	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

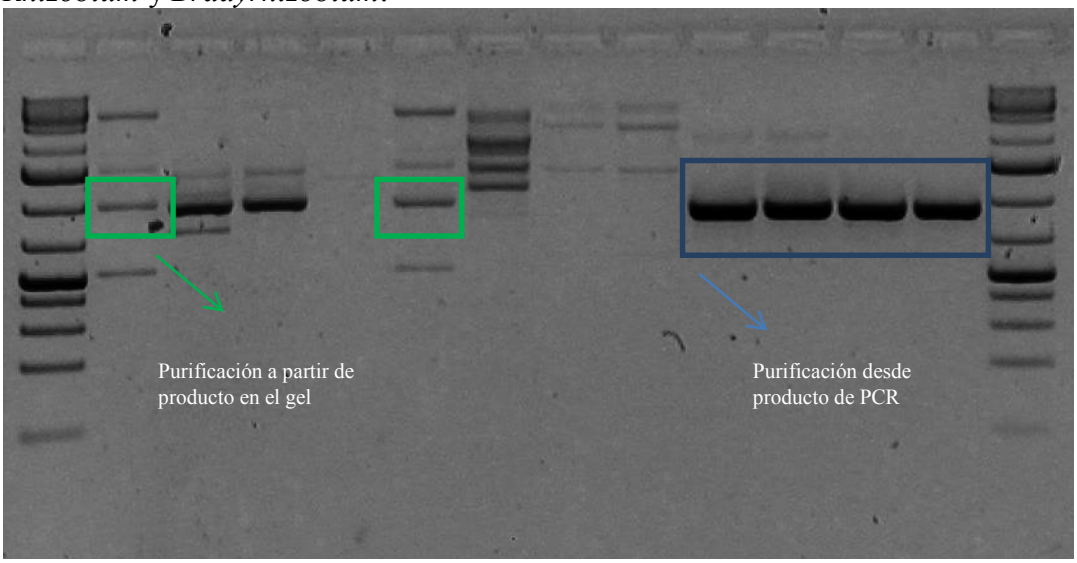
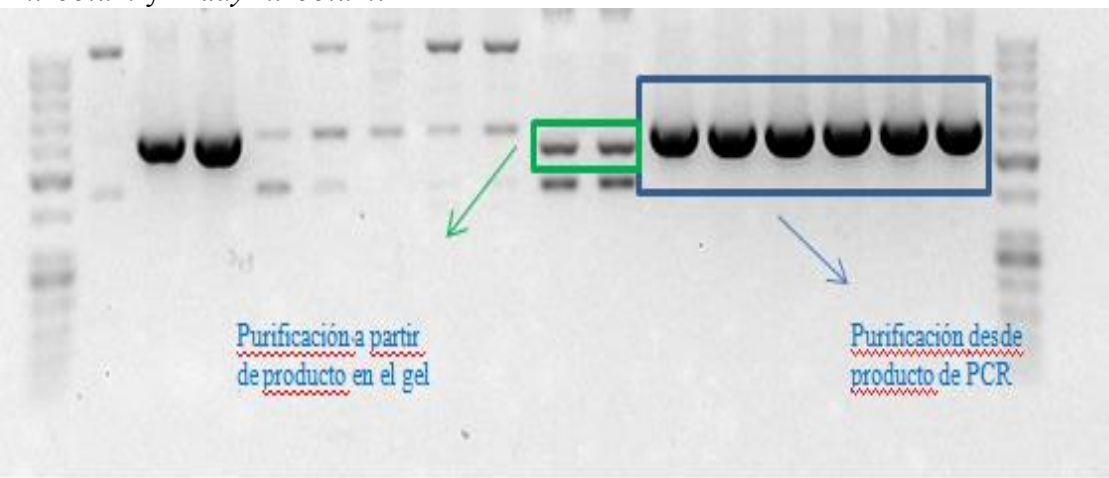
INB 832	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 833	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 834	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 835	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 836	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 837	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 838	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 839	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 840	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 841	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 842	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 843	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 844	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 845	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 846	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 847	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 848	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 849	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 850	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 851	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 852	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 853	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 854	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 855	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 856	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 857	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 858	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 859	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 860	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 861	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
INB 862	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 863	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 864	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 865	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)

INB 866	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 867	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
INB 868	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 869	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 870	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
INB 871	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 872	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
INB 873	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)

Apéndice 5. Crecimiento de cultivos aislados a partir de nódulos de poblaciones interespecíficas, en medio YMA+Azul de Bromotimol, utilizando como control las diferentes cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.



Apéndice 6. Gel de electroforésis con productos amplificados del gen *nod*C de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.



Apéndice 7.Gel de electroforésis con productos amplificados del gen *rec*A de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.