

**PRODUCCION DE HIBRIDOS E INCREMENTO EN LA COMPATIBILIDAD
DE Phaseolus vulgaris x Phaseolus acutifolius EN RETROCRUZAS
CONGRUENTES MEDIANTE RESCATE DE EMBRIONES**

POR:

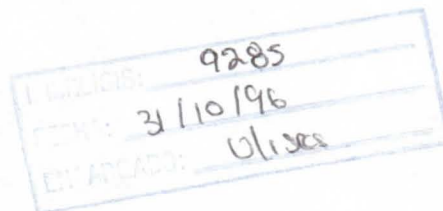
Luis Rodrigo Pérez Camacho

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PREVIO A LA

OBTENCION DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO



ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

AGOSTO, 1994

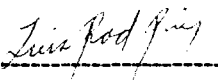
CPA-1994-7048 - OK.

PRODUCCION DE HIBRIDOS E INCREMENTO EN LA COMPATIBILIDAD
DE *Phaseolus vulgaris* x *Phaseolus acutifolius* EN RETROCRUZAS
CONGRUENTES MEDIANTE RESCATE DE EMBRIONES

Por

Luis Rodrigo Pérez Camacho

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana el
permiso para reproducir o distribuir copias de este trabajo
para los fines que considere necesarios. Para otras personas
y otros fines se reservan los derechos del autor.



Luis Rodrigo Pérez Camacho

Agosto - 1994

DEDICATORIA

A Dios por su inmenso amor y bondad.

A mis padres, Marina Rosa y Rafael por su amor, dedicación y sacrificios que nos han prodigado a nosotros sus hijos.

A mis hermanos, Adolfo, Ximena y Diego, por su apoyo, cariño y confianza.

A mi sobrinita Pamela por ser una persona tan especial en mi vida.

A mis cuñados Juan Pablo y Ana María por el apoyo y amistad que me han brindado.

BIBLIOTECA WILSON POPENOE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 88
TEGUCIGALPA HONDURAS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al Dr. Juan José Alán por la orientación brindada en el transcurso de mis estudios de cuarto año y en la realización de la presente investigación.

Al Dr. Wilfredo Cólón y al Dr. Juan Carlos Rosas por sus consejos y colaboración en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Francisco Gómez por su ayuda en el análisis estadístico realizado en este trabajo.

A la Ing. Agr. Aracely Castro, al Ing. Agr. David Rodríguez y al Ing. Agr. Oswaldo Varela, M.Sc. por sus consejos y apoyo brindado durante la realización de la tesis.

A Olga Murillo por su colaboración en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

A Leslie Colindres, Luz Henríquez, Carlos Alvarado, Jorge Sánchez y Roger Ramos por su ayuda en la realización de las hibridaciones interespecíficas.

Al Arq. Teodoro Albornoz y a Donaldo Cáceres por el trabajo de fotografía.

A la familia Holloway: Beth, Aldon, Braden y Hamptom y también a mis amigos Franklin Fernández, Rodrigo Salinas, Marco Vásquez, Iván Ortiz, Rodrigo Daza, Naozumi Tanaka, Luis Prado, Giacomo Pezzarossi, Edgar Fajardo, Carlos Fuentes, Ricardo Ewel, Edwin Ac Bol, Mario Justiniano, Clodys Menacho, Ostilio Almendarez, Xavier Sandoval, Edgardo Varela, Fernando Neri, Sergio Castro y Marco Zelada por la amistad que me brindaron durante mi carrera.

A la familia Beltrán en Tegucigalpa, Arnoldo, Delicia y Carlos por el cariño, la confianza, y amabilidad con que me han tratado durante mi permanencia en Honduras.

A mis queridos amigos Ace, en Bolivia, por su amistad y buenos momentos que disfrutamos juntos.

Al personal del Departamento de Agronomía que de una u otra manera ayudaron en la realización del trabajo.

INDICE

TITULO	i
APROBACION	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS	xiv
COMPENDIO	xvi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
A. Introducción	3
B. Problemática	4
C. Origen de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Phaseolus acutifolius</i>	5
D. Hibridación interespecífica entre las especies de <i>Phaseolus</i>	5
E. Rescate de embriones.....	7
F. Generaciones híbridas interespecíficas	9
G. Fertilidad de las generaciones híbridas interespecíficas	11
III. MATERIALES Y METODOS	12
A. Localización	12
B. Material genético para la obtención de híbridos F1	12
1. Características de los genotipos	13
a. <i>Phaseolus vulgaris</i>	13

b. <i>Phaseolus acutifolius</i>	13
C. Material genético del Programa de Investigaciones en Frijol	14
D. Siembra del material genético para la producción de híbridos F1	19
E. Hibridación entre <i>Pv</i> y <i>Pa</i> para la producción de híbridos F1	20
1. Material y equipo para realizar las hibridaciones	20
2. Cruzas interespecíficas entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	21
F. Rescate de embriones	22
1. Preparación del medio de cultivo	22
2. Esterilización del medio de cultivo	22
3. Material vegetal	22
4. Asepsia	23
5. Condiciones de crecimiento	25
G. Transplante y adaptación de los híbridos F1	25
H. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1	27
I. Retrocruzas congruentes	28
J. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza congruente (RC1)	29
K. Adaptación de las RC1	29
L. Pruebas de viabilidad de polen de las RC1	29
M. Autopolinización de RC1	29
N. Retrocruzas congruentes del material proveniente del PIF	29
Ñ. Prueba de viabilidad de polen del material proveniente del PIF	31
O. Producción de semilla	31
P. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	34

A. Hibridación interespecífica entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	34
B. Rescate de embriones	38
C. Transplante y adaptación de los híbridos F1	48
D. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1	55
E. Retrocruzas congruentes	56
F. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza RC1	59
G. Transplante y adaptación de las RC1	63
H. Pruebas de viabilidad de polen de las RC1	66
I. Autopolinización de RC1	67
J. Retrocruzas congruentes del PIF	68
K. Prueba de viabilidad del polen del material genético del PIF	70
L. Producción de semilla	73
V. DISCUSION	76
A. Hibridación interespecífica entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	76
B. Rescate de embriones	80
C. Transplante y adaptación de los híbridos F1	82
D. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1	84
E. Retrocruzas congruentes	85
F. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza RC1	86
G. Adaptación de las RC1	87
H. Prueba de viabilidad de polen de las RC1	88
I. Autopolinización de RC1	88
J. Retrocruzas congruentes del PIF	89
K. Prueba de viabilidad del polen del material genético del PIF	90
L. Producción de semilla	90

VI. CONCLUSIONES	91
VII. RECOMENDACIONES	92
VIII. LITERATURA CITADA.....	93

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Genotipos utilizados para la obtención de híbridos interespecíficos entre <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Phaseolus acutifolius</i>	13
Cuadro 2.	Fechas de siembra para el programa de hibridación interespecífica entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	19
Cuadro 3.	Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado para el cultivo de embriones provenientes de cruas interespecíficas entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	23
Cuadro 4.	Clave para la identificación de los híbridos F1 según la crua inicial entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	24
Cuadro 5.	Solución nutritiva (Broughton y Dillworth, 1970) utilizada para regar las plántulas F1 durante los primeros diez días de adaptación y la floración	27
Cuadro 6.	Porcentaje de prendimiento y características cuantitativas de las F1 entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	35
Cuadro 7.	Análisis de la variancia del prendimiento en la hibridación interespecífica entre <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Phaseolus acutifolius</i>	36
Cuadro 8.	Análisis de separación de medias del prendimiento en cruas interespecíficas entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i> según los genotipos utilizados como planta femeninas y masculinas	36
Cuadro 9.	Componentes de la variancia del prendimiento en las cruas interespecíficas entre <i>P. vulgaris</i> y <i>P. acutifolius</i>	37

Cuadro 10.	Promedios y rangos de días desde la cruza hasta el rescate, semillas por vaina y embriones rescatados por vaina	39
Cuadro 11.	Correlación entre la longitud de la vaina, el número de semillas por vaina y los días después de la cruza hasta el rescate de embriones F1	41
Cuadro 12.	Promedios y rangos de algunas características de los embriones y las plántulas F1 transplantadas	44
Cuadro 13.	Promedios, rangos y porcentajes de días desde el rescate hasta el transplante, F1 que florecieron y fertilidad del polen observados en las plantas F1 provenientes de cruces interespecíficos entre <i>Pv</i> y <i>Pa</i>	49
Cuadro 14.	Correlaciones entre el número de embriones F1 rescatados y el número de plántulas F1 transplantables	53
Cuadro 15.	Componentes de la variancia de la fertilidad del polen durante retrocruzas entre <i>P. vulgaris</i> (DOR 364) y los híbridos F1	55
Cuadro 16.	Análisis de variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas entre <i>P. vulgaris</i> (DOR 364) y los híbridos F1	56
Cuadro 17.	Porcentajes de prendimiento y características cuantitativas de las RC1 (DOR 364 x híbridos F1)	57
Cuadro 18.	Componentes de la variancia del prendimiento en las retrocruzas entre <i>P. vulgaris</i> (DOR 364) y los híbridos F1	58
Cuadro 19.	Análisis de la variancia del prendimiento en las retrocruzas entre <i>P. vulgaris</i> (DOR 364) y los híbridos F1	58

Cuadro 20.	Promedio y rangos de días desde la retrocruza hasta el rescate de embriones, semillas por vaina y embriones rescatados por vaina	60
Cuadro 21.	Promedios y rangos de algunas características cuantitativas de los embriones y las plántulas RC1 transplantadas	61
Cuadro 22.	Correlaciones entre la longitud de la vaina, el número de semillas por vaina y los días después de la retrocruza hasta el rescate de los embriones RC1	62
Cuadro 23.	Análisis de la variancia del número de semillas por vaina en las retrocruzas entre <i>P. vulgaris</i> (DOR 364) y los híbridos F1	62
Cuadro 24.	Promedios, rango y porcentajes de días desde el rescate hasta el transplante, RC1 que florecieron y fertilidad de polen observados en las plantas RC1	64
Cuadro 25.	Correlaciones entre el número de embriones RC1 rescatados y el número de plántulas RC1 transplantables	65
Cuadro 26.	Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas y autopolinización del material genético RC1	66
Cuadro 27.	Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta después de la autopolinización del material genético RC1	67
Cuadro 28.	Porcentajes de fertilidad del polen y semillas producidas en las retrocruzas congruentes (RC1) con materiales del PIF	71
Cuadro 29.	Porcentajes de fertilidad del polen y semillas producidas en las retrocruzas congruentes (RC2) con materiales del PIF	71

Cuadro 30.	Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas RC1 del PIF	72
Cuadro 31.	Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas RC2 del PIF	72
Cuadro 32.	Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC1 del PIF	73
Cuadro 33.	Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC2 del PIF	74
Cuadro 34.	Separación de medias del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC2 del PIF	74
Cuadro 35.	Correlación entre el prendimiento, la viabilidad del polen y el número de semillas por vaina en la fase de retrocruzas	75

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Entre los ocho y 24 días después de la hibridación se removieron las vainas de la planta madre. Nótese el pequeño tamaño de la vaina38
Fig. 2	Crecimiento de embriones híbridos provenientes de cruza interespecíficas entre <i>Pv</i> y <i>Pa</i> . De izquierda a derecha se muestra la forma ovoide de los cotiledones, la radícula agrandada en relación con los cotiledones, la diferencia en el tamaño en una mismo embrión y el crecimiento de la radícula y del tallo40
Fig. 3	Embrión normal de <i>Pv</i> , grande y verde y embrión F1 (<i>Pv</i> x <i>Pa</i>), pequeño y blanco, rescatados 16 días después de la hibridación Escala 1: 442
Fig. 4	Plántula híbrida (<i>Pv</i> x <i>Pa</i>) 15 días después del rescate. Se observa el desarrollo del tallo y las hojas primarias. La radícula no se desarrolló43
Fig. 5	Plántula híbrida (<i>Pv</i> x <i>Pa</i>) cinco días después del rescate. La raíz media aproximadamente 2.5 cm y el tallo 1 cm de longitud45
Fig. 6	Plántula híbrida (<i>Pv</i> x <i>Pa</i>) antes del transplante, 20 días después del rescate. Se puede notar el tallo delgado de apariencia débil y una hoja trifoliolada pequeña. Su sistema radical presenta la raíz principal y raíces secundarias46
Fig. 7	Plántula al momento del transplante, que muestra una hoja primaria entera y otra trifoliolada. Escala 2:147
Fig. 8	Plántula F1 (<i>Pv</i> x <i>Pa</i>) mostrando ramas desarrolladas a partir de yemas en el nudo cotiledonar. Nótese que la yema apical del tallo principal ha muerto48

- Fig. 9 De izquierda a derecha se muestra el tamaño de las plantas del *P. vulgaris* (izquierda), el híbrido F1 (centro) y del *P. acutifolius* (derecha) durante la etapa de floración. Se puede notar la pequeña altura del híbrido F1, aproximadamente de 20 cm50
- Fig. 10 Morfología de las hojas del híbrido F1 (*Pv* x *Pa*) en la etapa de floración. Nótese en la hoja trifoliolada (en la parte inferior izquierda) el foliolo terminal de forma redondeada y en la parte central (inferior y superior) foliolos lanceolados y ovoide-lanceolados, similares al del progenitor de *Pa*51
- Fig. 11 Hojas trifolioladas de *Pv* (izquierda), híbrido F1 (*Pv* x *Pa*) (centro) y de *Pa* (derecha) en la etapa de floración52
- Fig. 12 Nótese, de izquierda a derecha, la flor de color lila (89F-50-19); flor de color blanca (híbrido RP-15), flor blanca con tintes de color lila (híbrido RP-26) y flor blanca (DOR 391). Las vainas del híbrido, similares a las de *Pv*54
- Fig. 13 Planta RC1-RP26 en periodo de floración. Nótese en la hoja trifoliolada (parte superior derecha y parte inferior izquierda) el foliolo terminal de forma triangular similar al del progenitor *Pv*63
- Fig. 14 Plantas de la segunda retrocruza RC2 en la etapa de floración. Planta del genotipo 92-I9-RC2 (izquierda) proveniente de la retrocruza 89F-50-18 x 92-I9-RC1 que muestra el tipo de crecimiento y la morfología similar a su progenitor femenino (*Pa*). El genotipo 92-I7B-RC2 (derecha) proveniente de la retrocruza DOR 391 x 92-I7A-RC1 muestra características similares a *Pv*68
- Fig. 15 Nótese a la izquierda las flores y las vainas del 92-I7-RC2 descendiente de DOR 391 x 92-I7- RC1. Las vainas son similares a las del progenitor de *Pv*. En el 92-I9-RC2 (a la derecha), descendiente de 89F-50-18 x 92-I9-RC1, las vainas son similares a las del progenitor de *Pa*69

COMPENDIO

La hibridación interespecífica en el género *Phaseolus* es uno de los métodos más utilizados con el objetivo de transferir al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (*Pv*), características deseables tales como: tolerancia a sequía y a altas temperaturas y resistencia a enfermedades. El frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) (*Pa*), por su tolerancia a la sequía y al calor y resistencia a la bacteriosis común es un recurso genético con potencial en el mejoramiento del frijol común. A pesar de que el *Pa* pertenece al mismo género que *Pv*, la dificultad que existe para obtener híbridos entre estas dos especies hace que el *Pa* se encuentre dentro del reservorio terciario de genes de *Pv*, lo que significa que los híbridos obtenidos serán parcialmente estériles o estériles. El problema se presenta después de la polinización artificial donde las semillas en formación cesan su crecimiento y las vainas caen. El aborto de los embriones puede ocurrir entre los tres y 24 días después de la polinización. La utilización del rescate de embriones *in vitro* se ha utilizado para superar esta incompatibilidad.

El objetivo general de este estudio fue: estudiar la compatibilidad y fertilidad de los híbridos provenientes de cruzas interespecíficas entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*. Para alcanzar este objetivo se obtuvieron híbridos F1 mediante cruzamiento y rescate de embriones; de igual manera, se utilizó esta técnica en la primera retrocruza (RC1) y se evaluaron la fertilidad y compatibilidad de las plantas F1 y RC1. Se continuó con las retrocruzas congruentes del PIF.

Se utilizaron cuatro genotipos de *Pv* como plantas femeninas y cuatro genotipos de *Pa* como plantas masculinas. Se cruzaron todos los materiales de *Pv* con *Pa* tratando de realizar el mayor número posible de cruzas. El estudio se realizó en el Departamento de Agronomía de la EAP.

El prendimiento de las cruzas interespecíficas varía según el genotipo de *Pa* involucrado.

La fertilidad de las plantas RC1 fue, en promedio de 33%, mayor a la observada en las plantas F1 (17%).

Se obtuvieron un total de 170 semillas RC1. Probablemente, el uso de la técnica del rescate de embriones haya contribuido en gran manera a la producción de semilla híbrida F1 y especialmente para obtener los híbridos RC1.

En los materiales del PIF se observó un incremento de la fertilidad en los materiales RC1 y RC2 (de 33% a 37%), después de que se realizaron las retrocruzas congruentes.

I. INTRODUCCION

En Latinoamérica, los rendimientos del frijol común, *Phaseolus vulgaris* L. (*Pv*), son de 599 kg/ha, significativamente inferiores al potencial de rendimiento observado de este cultivo (mayores de 1000 kg/ha) (Singh, 1991; Pachico (1989) citado por Rosas, 1994).

Existen varios factores que limitan la productividad de *Pv*, entre los que se encuentran la irregularidad en la distribución de las lluvias y el ataque de plagas y enfermedades como la bacteriosis común, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*).

Con el objetivo de introducir algunas características deseables al *Pv* se ha utilizado al *Phaseolus acutifolius* (*Pa*), frijol tepari, que es una planta tolerante a la sequía y a las altas temperaturas y resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Haghighi y Ascher, 1988; Ortega, 1992).

A pesar de que el *Pa* pertenece al mismo género que el *Pv*, la dificultad que existe para obtener híbridos entre estas dos especies hace que se encuentre dentro del reservorio terciario de genes del *Pv*; lo que significa que los híbridos obtenidos serán estériles o tendrán características letales.

Durante los últimos años se han utilizado diferentes técnicas para obtener híbridos interespecíficos entre *Pv* y *Pa* con distintos resultados. La que mejores resultados ha dado es el rescate de embriones.

El problema surge después de la polinización artificial, donde las semillas cesan su crecimiento y las vainas caen. El aborto de embriones puede presentarse entre los tres y 24 días después de la polinización. Retrasos en la división del endosperma y del

embrión pueden ser las causas del aborto y, consecuentemente, del desprendimiento de la vaina (Sabja, Mok y Mok, 1990).

El programa de hibridación interespecífica entre *Pv* y *Pa*, en el Departamento de Agronomía de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), se inició en 1989 con el objetivo de transferir las características de tolerancia a la sequía y resistencia a la bacteriosis común del *Pa* al *Pv*. En un estudio realizado por Ortega (1992), obtuvo los híbridos F1 mediante rescate de embriones. La fertilidad de las plantas F1 fue baja, por lo que hizo retrocruzas congruentes; sin embargo, no realizó rescate de embriones y obtuvo muy poca semilla. Por esta razón, en el presente estudio, además de obtenerse plantas F1 (*Pv* x *Pa*) mediante rescate de embriones también se utilizó esta técnica en la primera generación de retrocruzas congruentes para incrementar el número y la fertilidad de los híbridos. De igual manera, se continuaron realizando retrocruzas congruentes con los materiales producidos en los trabajos anteriores.

El objetivo general en la presente investigación fue estudiar la compatibilidad y la fertilidad de los materiales híbridos provenientes de cruas interespecíficas entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener las plantas híbridas F1 (*Pv* x *Pa*) mediante hibridación y rescate de embriones.
2. Obtener plantas de la primera retrocruza congruente (RC1) con la ayuda de rescate de embriones.
3. Evaluar la fertilidad de las plantas F1 y RC1 por medio de la viabilidad del polen.
4. Continuar con las retrocruzas congruentes del programa de hibridación interespecífica entre *Pv* y *Pa* en la EAP.

II. REVISION DE LITERATURA

A. Introducción

El género *Phaseolus*, de la familia de las leguminosas, incluye aproximadamente 35 especies de las cuales cuatro son cultivadas, *Phaseolus vulgaris* o frijol común, *Phaseolus lunatus* o frijol lima, *Phaseolus coccineus* o frijol ayocote y *Phaseolus acutifolius* o frijol tepari (Evans, 1973; CIAT, 1980). De éstos, el frijol común es el principal, ya que suple la mayor cantidad de proteína en la dieta latinoamericana. Lastimosamente, es muy afectado por las enfermedades, los insectos y la sequía (Haghighi, 1987; Waines, Manshardt y Wells, 1988; Singh *et al.*, 1989; White e Izquierdo, 1989).

En Latinoamérica, el *Phaseolus vulgaris* L. (Pv) es cultivado por pequeños agricultores que producen aproximadamente un 48% de la producción mundial (3983 millones de toneladas). Los rendimientos obtenidos son alrededor de 599 kg/ha, significativamente inferiores al potencial de rendimiento observado de este cultivo con mejores prácticas de producción (mayores de 1000 kg/ha) (Singh, 1991; Pachico (1989) citado por Rosas, 1994). Por otro lado, el frijol tepari, *Phaseolus acutifolius* A. Gray (Pa), a pesar de ser una especie tolerante a la sequía, al calor y resistente a las enfermedades y los insectos se cultiva en algunas regiones del noroeste de México y suroeste de los Estados Unidos, pero con baja intensidad de producción (Nabhan y Felger., 1978; CIAT, 1980; Haghighi, 1987; Ortega, 1992).

B. Problemática

En Latinoamérica, en general, el frijol común se siembra dos veces al año de acuerdo con el régimen de lluvias (Thung, 1991; Rosas, 1994). En la época lluviosa la precipitación es mayor al requerimiento de agua del cultivo. El exceso de agua se acumula en los suelos y causa encharcamiento, dificulta la recolección del grano en el campo ya que la cosecha coincide con este periodo; consecuentemente, causa pérdidas del grano por viviparidad y aumenta el ataque de patógenos (Serracin *et al.*, 1991; Thung, 1991).

Por otro lado, en la época seca la distribución de la lluvia es escasa y se presenta estrés hídrico en la etapa reproductiva de la planta y en casos extremos puede causar disminuciones entre 35% y 71% en el rendimiento (Dubets y Mahalle (1969), citados por Thung, 1991).

El frijol común es susceptible a enfermedades virales, bacterianas y fúngicas (Sabja, Mok y Mok, 1990). La bacteriosis común, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (*Xcp*), ha sido reconocida como la enfermedad bacteriana más importante del frijol. Condiciones climáticas de alta humedad relativa y altas temperaturas (28°C a 30°C) favorecen la aparición y diseminación de este patógeno. La bacteria es capaz de infectar el follaje, los tallos, las vainas y las semillas y de sobrevivir en los residuos de la cosecha. En el frijol, la presencia de esta enfermedad se ha observado tanto en la época lluviosa como en la seca, pudiendo causar pérdidas en el rendimiento entre 22% y 42% (Serracin *et al.*, 1991).

Singh *et al.* (1989), sugieren que la mejor manera para maximizar los rendimientos del frijol común sin incrementar los costos de producción que estén al alcance del agricultor es desarrollar variedades que reúnan características de tolerancia al estrés hídrico, al calor y resistencia a las enfermedades.

C. Origen de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*

Todas las especies cultivadas del género *Phaseolus* son diploides, $2n=2x=22$. El frijol común es originario de Mesoamérica o Sudamérica (Scott, 1968; Brücher y Brücher, 1976; CIAT, 1980; Evans, 1980; Kaplan, 1981; Hucl y Scoles, 1985; Gepts y Debouck, 1991). Las principales evidencias de su centro de origen están basadas tanto en datos arqueológicos como en hallazgos de semillas y pedazos de vainas que datan de 10.000 años de antigüedad, estudios geobotánicos como la distribución de las especies silvestres del frijol común en algunas regiones de México y Argentina, datos históricos como textos españoles del siglo dieciséis que mencionan al frijol común y evidencias lingüísticas como algunas palabras de varias lenguas nativas, entre ellas el quechua, el aymara, y el maya que nombran al frijol común en su vocabulario (Gepts y Debouck, 1991; Rosas, 1994).

Por otro lado, el *Phaseolus acutifolius* es originario de las regiones secas y áridas, de lo que hoy son el suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y el noroeste de México. Según los registros arqueológicos, su antigüedad como especie cultivada data de alrededor de 5000 años A.C. (CIAT, 1980). Es tolerante a las altas temperaturas y al estrés hídrico (Haghighi, 1987). Se adapta al calor y a los climas semiáridos. También es resistente a la bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye), el chancro de la raíz (*Macrophomina phaseolina*) y al insecto *Empoasca kraemeri* (Nabhan y Felger, 1978; Waines, Manshardt y Wells, 1988).

D. Hibridación interespecífica entre las especies de *Phaseolus*

El primer informe acerca de un intento para obtener híbridos interespecíficos en el género *Phaseolus* fue el cruce realizado por Mendel en 1865 (Yarnell, 1965 citado por Hucl y Scoles, 1985) entre *P. vulgaris* y *Phaseolus coccineus*. Por otro lado, en 1935

Mackie y Smith (citados por Thomas y Waines, 1984) informaron cruzamientos entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Debido a que existen ciertas dificultades al hibridizar dentro y entre especies en algunos géneros, Harlan y de Wet (1971) (citados por Haghighi, 1987; Waines, Manshardt, Wells, 1988), tomando como base la afinidad reproductiva, clasificaron a las especies en reservorio o acervo primario, secundario y terciario de genes. En el género *Phaseolus* las especies de poblaciones domesticadas y silvestres que se pueden hibridizar libremente con *Phaseolus vulgaris* sin ningún inconveniente, pertenecen al acervo primario. El reservorio secundario incluye al *Phaseolus coccineus*, donde la transferencia de genes es posible pero con dificultades. Finalmente, el *Phaseolus lunatus* y el *Phaseolus acutifolius* se encuentran dentro del reservorio terciario, donde se dificulta aún más el flujo libre de genes para obtener híbridos entre estas especies y donde los híbridos pueden ser letales o estériles (Haghighi, 1987; Andrade-Aguilar y Jackson, 1988; Waines, Manshardt y Wells, 1988).

El problema que se presenta en la hibridación interespecífica entre *Pv* y *Pa* es el aborto prematuro de los embriones que ocurre normalmente entre los tres y 24 días después de la polinización artificial. Retrasos en la división de las células del endosperma y del embrión pueden ser las causas del aborto y consecuentemente del desprendimiento de la vaina (Honma, 1956; Al-Yasiri y Coyne, 1966; Smart, 1970; Mok, Mok y Rabakoarihanta, 1978; Rabakoarihanta, Mok y Mok, 1979; Thomas y Waines, 1984; Andrade- Aguilar y Jackson, 1988; Young, Alán y Rosas, 1988; Ortega, 1992).

El éxito en la hibridación interespecífica entre *Pv* y *Pa* depende de varios factores, entre ellos la técnica de polinización utilizada, las condiciones de crecimiento en cuanto a temperatura y humedad relativa, y las especies y genotipos utilizados como planta

femenina o masculina (Smart, 1970; Thomas y Waines, 1984; CIAT, 1980; Andrade-Aguilar y Jackson, 1988; Pratt, Bressan, Hasegawa, 1985).

Se han encontrado diferencias en la eficiencia del prendimiento de cruces recíprocos interespecíficos entre el frijol común y el frijol tepari. Honma (1956), Al-Yasiri y Coyne (1966), Smartt (1970), Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978) y Andrade-Aguilar y Jackson (1988), indican que, en general, el *P. vulgaris* tiene mayor éxito de prendimiento como planta femenina comparado con el *P. acutifolius*; ésto se debe, principalmente, a que las partes florales del *P. acutifolius* son más pequeñas y delicadas, lo cual dificulta su manipulación (Strand, 1942). Sin embargo, Thomas y Waines (1984) informaron que no hay diferencias recíprocas en la hibridación interespecífica entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) indicaron que en los programas de mejoramiento fitogenético del frijol común, la mejor combinación parental para obtener exitosamente híbridos interespecíficos, es la utilización de plantas heterocigotas resultado de diversos cruces intraespecíficos, tanto para el *P. vulgaris* como en el *P. acutifolius*.

E. Rescate de embriones

Los embriones híbridos interespecíficos provenientes de cruces entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*, generalmente cesan su crecimiento antes de llegar a su madurez (Sabja, Mok y Mok, 1990). El uso de técnicas *in vitro* a través del cultivo de embriones es requerida para la obtención de plantas híbridas interespecíficas (Pratt, Bressan y Hasegawa, 1985; Young, Alán y Rosas, 1988).

El primer cruce interespecífico entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* utilizando medio de cultivo artificial fue hecho por Honma (1955) (citado por Waines, Manshardt y Wells, 1988).

Honma (1956), Smart (1970), Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978), Rabakoarihanta, Mok y Mok (1979), CIAT (1980), Thomas y Waines (1984), Pratt, Bressan y Hasegawa (1985), Haghighi (1987), Andrade-Aguilar y Jackson (1988), Haghighi y Ascher (1988), Waines, Manshardt y Wells (1988), Young, Alán y Rosas (1988) Sabja, Mok y Mok (1990) y Ortega (1992) obtubieron embriones híbridos provenientes de cruza interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* con distinto éxito, después de utilizar el cultivo *in vitro*.

Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) y Waines, Manshardt y Wells (1988) informaron que el crecimiento de los embriones híbridos entre *Pv* y *Pa* y de las plántulas F_1 está determinado por el progenitor femenino utilizado.

Nestling y Morris (1979) (citados por Sabja, Mok y Mok, 1990) indican que las bases fisiológicas para la obtención de híbridos entre *Pv* y *Pa* todavía no se conocen. Igualmente, informan que posiblemente existe un desbalance en la biosíntesis y metabolismo hormonal de los embriones ya que éstos contienen menor cantidad de citocininas extraíbles comparados con sus progenitores.

Rabakoarihanta, Mok y Mok (1979) y Ortega (1992) informaron la crusa de varios genotipos de *Pv* y *Pa*, y utilizaron la técnica del rescate de embriones para obtener híbridos F_1 . Posteriormente, retrocruzaron las F_1 obtenidas de la crusa inicial con alguno de los progenitores. En esta fase no utilizaron el cultivo *in vitro* y obtuvieron poca o ninguna semilla. Concluyeron que, definitivamente, se debe utilizar la técnica del rescate de embriones para obtener descendencia de la primera crusa y la primera retrocruza (F_1 , RC_1).

Al-Yasiri y Coyne (1964) indicaron que con la ayuda de reguladores de crecimiento se puede retrasar la caída de las vainas y el aborto de los embriones, y, consecuentemente, se pueden obtener embriones híbridos de mayor tamaño. Sabja, Mok y Mok (1990) informaron que los embriones híbridos de mayor tamaño cultivados *in vitro*, son los que tienen el mejor crecimiento durante su cultivo y permiten una mayor cantidad de plántulas transplantables.

El éxito en la supervivencia de los embriones híbridos depende de los requerimientos nutricionales, del medio de cultivo y de los genotipos utilizados. Por esta razón, se debe establecer un medio de cultivo óptimo para cultivarlos (Sabja, Mok y Mok, 1990; Ortega, 1992).

F. Generaciones híbridas interespecíficas

Andrade-Aguilar y Jackson (1984), informaron que para que un programa de fitomejoramiento sea exitoso se requieren poblaciones grandes de híbridos F_1 . Adicionalmente, Waines, Manshardt y Wells (1988) informaron que el potencial de obtención de híbridos F_1 está influido por el genotipo de *P. vulgaris* utilizado como planta femenina.

Rabakoarihanta, Mok y Mok (1979); Thomas y Waines (1984) observaron que la generación de la primera retrocruza (F_1 RC_1) produce poca semilla. Por esta razón, concluyeron que en un programa de fitomejoramiento por lo menos diez plantas F_1 RC_1 son necesarias para transferir caracteres a la población F_2 autofecundada.

Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) indican que el potencial para la obtención de plantas F_1 RC_1 está controlado por el genotipo del híbrido interespecífico F_1 y no por el padre recurrente.

Haghighi y Ascher (1988) indican que las retrocruzas recurrentes, que consisten en retrocruzar los híbridos hacia uno de los progenitores, son ineficientes ya que retrasan el tiempo en que las características deseables de los padres (como el número de semillas por vaina) se mantienen en la descendencia. Por otro lado, Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) informaron que las retrocruzas congruentes, que consisten en retrocruzar los híbridos con cada padre en forma alternada, pueden ser una solución a los problemas en la obtención de generaciones avanzadas de híbridos interespecíficos, debido a que en la quinta o sexta generación las plantas F_1 RC_1 producen un número de semillas por vaina, similar al de los progenitores.

Coyne (1964), Al-Yasiri y Coyne (1966) sugieren que el uso de una tercera especie como "puente" es una alternativa para obtener híbridos interespecíficos entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*. El *Phaseolus coccineus*, por tener afinidad reproductiva con ambas especies, es una buena opción para servir como puente. Sin embargo, Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) indican que la utilización del *P. coccineus* es muy complicada y que el uso de diversos genotipos del reservorio primario de genes como progenitores, es una mejor alternativa para recuperar características deseables entre el frijol común y el frijol tepari.

Se ha intentado producir alotetraploides usando colchicina para duplicar los cromosomas (colchiplóides) y así mantener la fertilidad de los híbridos entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*, para aumentar la fertilidad del polen (Hucl y Scoles, 1985) e incrementar el número de vainas en comparación con los híbridos diploides (Thomas y Waines, 1984).

Waines, Manshardt y Wells (1988) indicaron que es conveniente realizar un mapeo cromosómico en los híbridos interespecíficos para comprobar la existencia o ausencia de recombinación genética. De igual manera, otros investigadores utilizaron

otras técnicas para comprobar el intercambio de genes en la descendencia. Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) utilizaron análisis de proteínas en la semilla. Haghighi (1987) y Haghighi y Ascher (1988) utilizaron electroforesis basándose en los patrones de peroxidasa de los tejidos de la raíz para verificar híbridos interespecíficos F_1 y la primera retrocruza RC_1 .

G. Fertilidad de las generaciones híbridas interespecíficas

Andrade-Aguilar y Jackson (1984) informaron que los híbridos F_1 pueden ser estériles o parcialmente fértiles y que están influidos por el genotipo de *P. vulgaris* utilizado como planta femenina. Thomas y Waines (1984); Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) informaron que la fertilidad de los F_1 es variable y que fluctúa entre 0% y 38%.

Rabakoarihanta, Mok y Mok (1980) indican que la primera retrocruza (F_1 RC_1) es normalmente estéril o parcialmente estéril. Adicionalmente, Thomas y Waines (1984) informan que la viabilidad del polen puede variar entre 0% y 49%. Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) informaron que en generaciones posteriores de retrocruzas (F_1 RC_2 y F_1 RC_3) y autopolinizaciones F_2 se incrementa la fertilidad.

Pratt, Bressan y Hasegawa (1985) informaron que la fertilidad de las plantas F_1 RC_1 está controlada por el híbrido F_1 y no por la especie con la cual se cruza.

Haghighi y Ascher (1988) indican que existe una relación entre la fertilidad de los híbridos y el número de semillas por vaina, que son importantes para evaluar las siguientes generaciones.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Localización

El estudio se realizó en el Departamento de Agronomía de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), en el valle del río Yeguary, Zamorano, Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Las cruces se efectuaron en tres invernaderos y una casa de malla del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), y las pruebas de viabilidad del polen y el rescate de embriones en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Agronomía.

B. Material Genético para la Obtención de Híbridos F1

Los materiales de *Phaseolus vulgaris* (Pv) y *Phaseolus acutifolius* (Pa) (Cuadro 1) que se usaron son los más utilizados en programas de mejoramiento de la EAP ya que han presentado las mejores características agronómicas y morfológicas en ensayos previos (Young, Alán y Rosas, 1988; Ortega, 1992).

Algunas líneas de *P. acutifolius* fueron recolectadas por el proyecto colaborativo entre el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR, siglas en inglés) y la EAP, y otras líneas fueron donadas por el Dr. Peter Ascher de la Universidad de Minnesota, EE.UU. y el Dr. George Freytag, anterior genetista de la Estación de Investigación de Agricultura Tropical (TARS, siglas en inglés) en Puerto Rico.

Los genotipos de Pv se enumeraron del 1 al 4 y los de Pa del 5 al 8 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genotipos utilizados para la obtención de híbridos interespecíficos entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*.

<i>P. vulgaris</i> : DOR 364 (1) ^z	<i>P. acutifolius</i> : 89F-50-18 (5)
DOR 391 (2)	89F-50-19 (6)
DOR 482 (3)	A-80-10 (7)
DANLI 46 (4)	F-0078 (8)

^z Los números entre paréntesis indican la identificación del genotipo

1. Características de los Genotipos

a. Phaseolus vulgaris

- a. La variedad comercial DOR 364 es de alto rendimiento y tiene resistencia al virus del mosaico común y es tolerante al virus del mosaico dorado.
- b. La línea mejorada DOR 391 y la variedad DOR 482 son de alto rendimiento y tienen resistencia al virus del mosaico dorado y mosaico común.
- c. La variedad comercial DANLI 46 es cultivada en muchas regiones de Honduras.

b. Phaseolus acutifolius

- a. Las líneas 89F-50-18 y 89F-50-19, se consideran excelentes fuentes de resistencia a *Xcp* y son tolerantes al estrés hídrico.
- b. La línea A-80-10 tiene buena adaptación y rendimiento, es tolerante a la sequía y a *Xcp*. Ha sido utilizada para varios trabajos de cruces interespecíficos con *Pv* en el Departamento de Agronomía de la EAP.
- c. La línea F0078, fue colectada en la zona sur de Honduras por el Proyecto IBPGR/EAP. Presenta buen grado de adaptación local, es tolerante a la sequía y resistente a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xcp*).

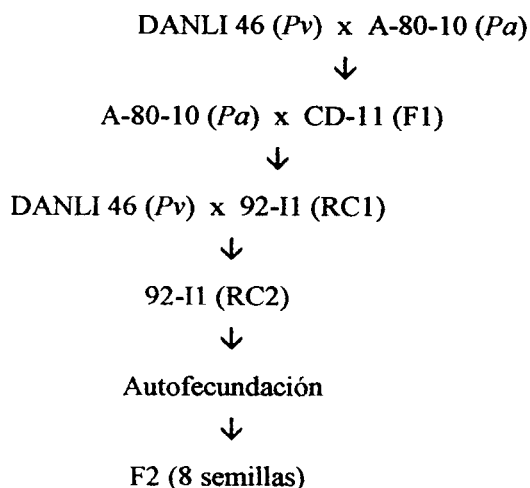
C. Material Genético del Programa de Investigaciones en Frijol

Se continuó con las retrocruzas congruentes de materiales F2 de que disponía el Programa de Investigaciones en Frijol (PIF). La obtención de los materiales utilizados en el estudio se describen en los procedimientos siguientes:

Para obtener el material híbrido interespecífico 92-I1 (RC2) se cruzó inicialmente el progenitor DANLI 46 (*P. vulgaris*), con A-80-10 (*P. acutifolius*) como planta masculina; de dicha crusa se produjo el híbrido F1 (CD-11) el cual se retrocruzó con el progenitor A-80-10 (*P. acutifolius*) para producir individuos de primera retrocruza 92-I1 (RC1). Posteriormente, la 92-I1 (RC1) se retrocruzó con el progenitor DANLI 46 (*P. vulgaris*) produciéndose individuos de segunda retrocruza 92-I1 (RC2) y éstos se autofecundaron y produjeron 8 semillas F2.

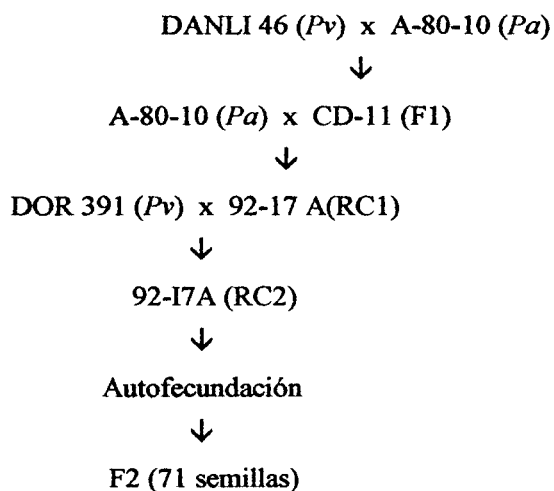
Este procedimiento para obtener el híbrido 92-I1 (RC2) se resume de la manera siguiente:

92-I1 (RC2)

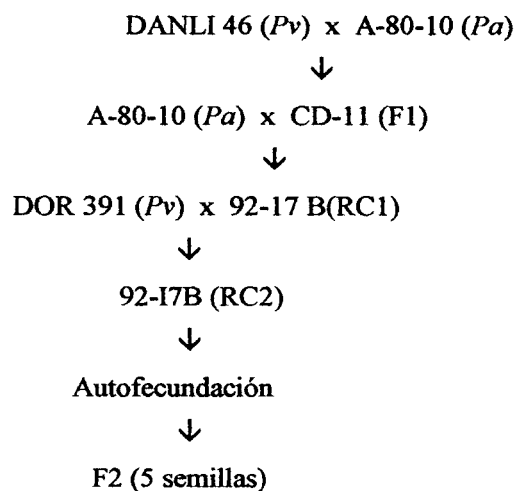


El procedimiento para obtener el híbrido interespecífico 92-I7A (RC2) y 92-I7B (RC2) fue similar al 92-I1 (RC2). La diferencia fue que se utilizaron genotipos distintos al del progenitor *P. vulgaris* original cuando se retrocruzó el 92-I7 A(RC1) y 92-IB (RC1), este fue DOR 391.

92-I7A (RC2)

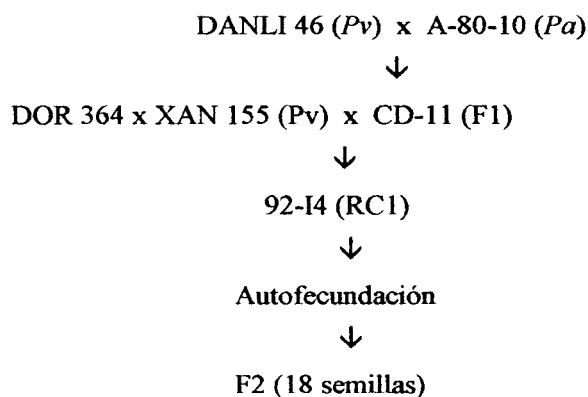


92-17B (RC2)



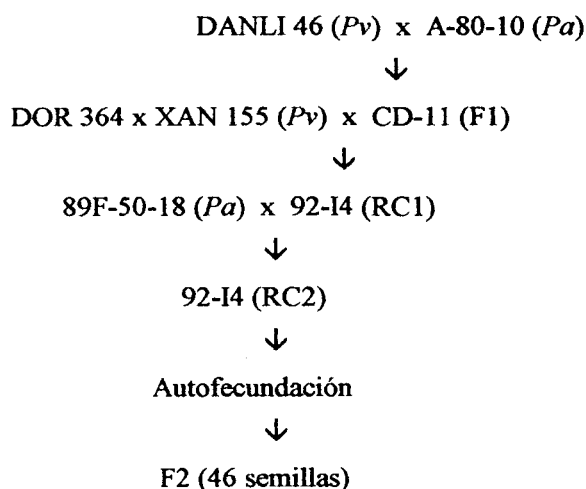
Para obtener el híbrido interespecífico 92-I4 (RC1) se autofecundó inmediatamente después de obtenida la RC1 para aumentar el número de semillas disponibles. El siguiente esquema describe el procedimiento.

92-I4 (RC1)

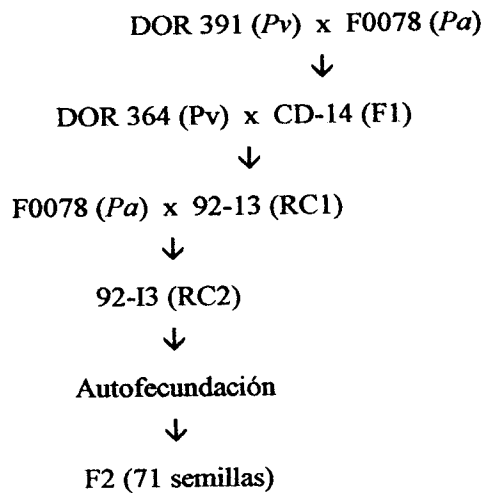
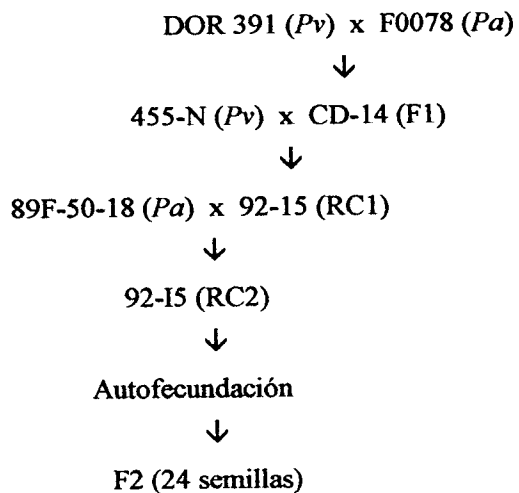
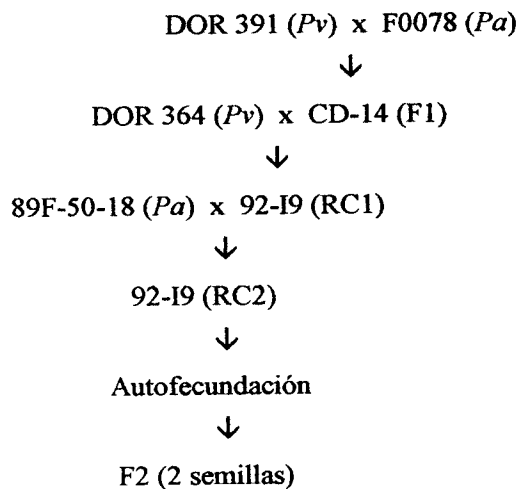


Para obtener el híbrido interespecífico 92-14 (RC2) se cruzó inicialmente el progenitor DANLI 46 (*P. vulgaris*) con A-80-10 (*P. acutifolius*). De dicha cruce se produjo el híbrido F1 (CD-11), el que se retrocruzó con *P. vulgaris* (DOR 364 x XAN 155) para producir individuos de la primera retrocruza 92-I4 (RC1). Posteriormente, la 92-I4 (RC1) se retrocruzó con 89F-50-18 (*P. acutifolius*) produciéndose individuos de segunda retrocruza 92-I4 (RC2); éstos se autofecundaron y se produjeron 46 semillas F2. Este procedimiento se resume de la manera siguiente:

92-I4 (RC2)

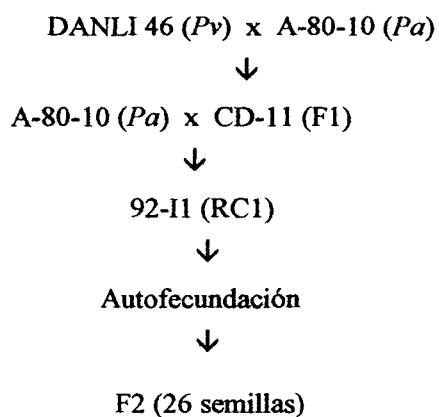


Los procedimientos para obtener los híbridos interespecíficos 92-I3 (RC2), 92-I5 (RC2) y 92-I9 (RC2) fueron similares al usado con 92-I4 (RC2); la diferencia consistió en el uso de diferentes genotipos parentales para la producción de la primera (RC1) y segunda (RC2) retrocruzas de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

92-I3 (RC2)**92-I5 (RC2)****92-I9 (RC2)**

El procedimiento para obtener el híbrido interespecífico 92-I1 (RC1) fue parecido al usado para obtener el 92-I4 (RC2), con la diferencia de que éste se autofecundó inmediatamente después de obtener la primera retrocruza. Se utilizó el mismo progenitor de *P. acutifolius* en todo el proceso.

92-I1 (RC1)



D. Siembra del Material Genético para la Producción de Híbridos F1

El material genético se sembró en los invernaderos del PIF, en macetas de ocho pulgadas de diámetro.

Se realizaron 16 tratamientos con cuatro repeticiones. Se consideró un tratamiento como la cruza de cada uno de los cuatro materiales de *Pv* con cada uno de los cuatro genotipos de *Pa*.

Las fechas de siembra aparecen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Fechas de siembra para el programa de hibridación interespecífica entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

<i>Material genético</i> ^z	<i>Repeticón</i>	<i>Fecha de siembra</i>	<i>Cantidad de macetas</i>	<i>Total de plantas</i>
<i>Pv</i>	1	5-Nov-93	64	128
<i>Pa</i>	1	12-Nov-93	32	64
<i>Pv</i>	2	12-Nov-93	64	128
<i>Pa</i>	2	19-Nov-93	32	64
<i>Pv</i>	3	8-Dic-93	80	160
<i>Pa</i>	3	14-dic-93	40	80
<i>Pv</i>	4	8-Dic-93	80	160
<i>Pa</i>	4	14-dic-93	40	80

^z Material genético de *P. vulgaris* y *P. acutifolius*

El *Pv* se sembró con una semana de anterioridad a *Pa* para sincronizar la floración y se utilizó una proporción de plantas de 2: 1, respectivamente.

Se utilizó medio de crecimiento compuesto de dos partes de suelo, una de arena y dos de materia orgánica. El medio de crecimiento se esterilizó en un esterilizador eléctrico a 200 °C durante 45 minutos. Todos los materiales de *Pv* y *Pa* se sembraron colocando cinco semillas por maceta. Se identificaron con una etiqueta de plástico donde se anotó la variedad, la fecha de siembra y la repetición. Seguidamente, se las distribuyó sobre los bancales del invernadero de tal forma que quedaran agrupadas, por un lado, las plantas femeninas (*P. vulgaris*) y por otro las masculinas (*P. acutifolius*), para facilitar la manipulación de las plantas al momento de la recolección de flores y de realizar las cruza. Una vez que desarrollaron las hojas primarias se procedió al raleo, dejando únicamente las dos plántulas más vigorosas. Inmediatamente después se colocaron varillas de bambú y sujetadores de alambre para mantenerlas erectas. Se aplicó un fertilizante foliar (Nitrofosca 20-20-0) a una dosis de 3.50 g/L. De igual manera, se hicieron aplicaciones semanales de fungicidas cúpricos (triadimefon) e insecticidas (Metamidofos), para prevenir especialmente la roya, *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. y el minador de la hoja, *Liriomyza sativae* (Blanc.), respectivamente. Se realizó una segunda fertilización foliar con 20-20-0 al momento de la floración. Las macetas se regaron todos los días por la mañana, al medio día y por la tarde.

E. Hibridación entre *Pv* y *Pa* para la producción de híbridos F1

Las hibridaciones se iniciaron cuando comenzó la floración. El *P. vulgaris* se utilizó como planta femenina y el *P. acutifolius* como planta masculina.

1. Material y equipo para realizar las hibridaciones

El material básico constó de bandejas para la recolección de las flores del progenitor masculino, pinzas para efectuar la emasculación y la polinización, alcohol al

95% para la desinfección de manos y pinzas para evitar contaminación con polen extraño, cinta adhesiva transparente y etiquetas de cartulina con hilo. Se utilizaron hojas de registro para anotar los cruces.

2. Cruzas interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*

Para las cruzas controladas se utilizó la técnica conocida como "método de la emasculación con el estigma desnudo" (CIAT, 1982), que consiste en utilizar botones florales de las plantas madres en los que no ha ocurrido la antesis, lo que asegura que no ha habido autofecundación. Se eliminaron cuidadosamente las alas y la quilla dejando únicamente el estandarte para protección del estigma. La emasculación se realizó eliminando las anteras. Se seleccionaron flores recién abiertas del progenitor masculino. Se les removió el estigma impregnado de polen y se llevó al estigma de la flor madre. Ambos estigmas se frotaron y se dejaron entrelazados para asegurar la fecundación. Posteriormente, el botón floral polinizado se cerró y se colocó una cinta adhesiva transparente alrededor del mismo. Finalmente, en el pedúnculo de la flor fecundada se colocó una etiqueta para identificar el cruzamiento, la fecha de cruza, las iniciales del cruzador y el número de la repetición a la que correspondía. Los botones florales y las flores que no se utilizaron para las cruzas, se eliminaron de la planta femenina.

Las cruzas se realizaron durante las primeras horas de la mañana en los invernaderos y en la casa de malla donde las temperaturas variaban entre 18 y 27°C. Se realizaron el mayor número de cruzas posibles entre *Pv* y *Pa*.

F. Rescate de embriones

Para aumentar la probabilidad de éxito en la obtención de híbridos interespecíficos entre *Pv* y *Pa* se utilizó la técnica de "rescate de embriones".

Este método consiste de los siguientes pasos:

1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fueron las sales de Murashige y Skoog MS (1962) modificado (Cuadro 3), al 50% de concentración, en el que no se utilizaron hormonas. Se prepararon soluciones madres de macroelementos y microelementos, 10 veces y 1000 veces más concentrados que el medio original, respectivamente, para facilitar la preparación del medio de cultivo. De igual manera, se hicieron soluciones madres para ácido nicotínico, piridoxina y tiamina con una relación de 1:1 (100 g: 100 ml). El medio de cultivo se solidificó con Agargel^R al 4.25%.

El medio de cultivo se preparó de manera similar a la que describe Ortega (1962). Se utilizaron tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 ml de medio de cultivo.

2. Esterilización del medio de cultivo

Los tubos de ensayo, conteniendo el medio de cultivo, se esterilizaron en un autoclave automático a 1.06 kg de presión por cm² a 120 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se guardaban hasta el momento de su utilización en un refrigerador a 4 °C de temperatura.

3. Material vegetal

Las vainas que se originaron de las cruzas interespecíficas se cosecharon e identificaron según la repetición y se registró su longitud y su diámetro. Así mismo, se registraron la fecha de cruce, las iniciales del cruzador y la clave de cruce (Cuadro 4).

Cuadro 3. Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado para el cultivo de embriones provenientes de cruas interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Macroelementos	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650.0
K NO ₃	1900.0
Ca Cl ₂ . 2H ₂ O	440.0
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0
EDTA Fe Na	37.3
Microelementos	mg/L
K CL	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
Mn SO ₄ . H ₂ O	16.90
Zn SO ₄ . 7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
Cu SO ₄ . 5H ₂ O	0.025
Co Cl ₂ . 6H ₂ O	0.025
Inositol	0.025
Acido nicotínico	0.025
Piridoxina	0.025
Tiamina	0.005
Sacarosa	30000.0
Agar- gel	3750.0
El pH se reguló a 5.7 utilizando K OH	

4. Asepsia

Antes de rescatar los embriones híbridos, la cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 70%. Las vainas se desinfectaron durante cinco minutos con alcohol al 70% y durante 20 minutos con hipoclorito de sodio al 0.25% con una o dos gotas de un agente dispersante (Tween 80) por cada 100 ml de solución.

Cuadro 4. Clave para la identificación de los híbridos F1 según la crucea inicial entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

DOR 364 x 89F-50-18	= RP ^Z -15 ^Y
DOR 364 x 89F-50-19	= RP-16
DOR 364 x A-80-10	= RP-17
DOR 364 x F0078	= RP-18
DOR 391 x 89F-50-18	= RP-25
DOR 391 x 89F-50-19	= RP-26
DOR 391 x A-80-10	= RP-27
DOR 391 x F0078	= RP-28
DOR 482 x 89F-50-18	= RP-35
DOR 482 x 89F-50-19	= RP-36
DOR 482 x A-80-10	= RP-37
DOR 482 x F0078	= RP-38
DANLI 46 x 89F-50-18	= RP-45
DANLI 46 x 89F-50-19	= RP-46
DANLI 46 x A-80-10	= RP-47
DANLI 46 x F0078	= RP-48

^Z RP = Rodrigo Pérez

^Y El primer dígito corresponde a la línea parental *Pv* y el segundo a la de *Pa*

Las vainas, después de desinfectadas, se enjuagaron tres veces y se pusieron en platos de Petri esterilizados que contenían discos de papel filtro. Las vainas se abrieron con un bisturí por la sutura ventral, se les extrajo las semillas y se disecaron con la ayuda de un estereoscopio, pinzas y agujas hipodérmicas. Cada embrión rescatado se colocó en un tubo de ensayo. Cada tubo, después de que su boca se había flameado para evitar contaminación, se tapaba y sellaba con papel parafinado (Parafilm^R) y se identificaba. Al mismo tiempo se registraron:

1. Identificación de la crucea realizada según clave (Cuadro 4)
2. Número de semillas por vaina

3. Número de embriones rescatados por vaina
4. Fecha del rescate
5. Días desde la cruce hasta el rescate

Se creó una clave para la identificación de los híbridos F1 (Cuadro 4). Se nombró al híbrido con las iniciales del nombre del investigador y los números que aparecen después de las iniciales corresponden al genotipo de *Pv* o *Pa* utilizado (ver Cuadro 1).

5. Condiciones de crecimiento

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento en completa oscuridad durante tres a cinco días, a una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se trasladaron a la luz con un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad con una radiación fotosintéticamente activa (RFA) de $54 \text{ micromol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

G. Transplante y adaptación de los híbridos F1

Una vez desarrolladas las plántulas F1 se tomaron los siguientes datos:

1. Longitud de las raíces (cm)
2. Longitud del hipocótilo (cm)
3. Longitud del epicótilo (cm)
4. Número de hojas simples y trifolioladas
5. Días desde el rescate hasta el transplante

Los trasplantes se realizaron en las primeras horas de la mañana o últimas de la tarde en un invernadero con 30% de sombra. Las plántulas se sacaron de los tubos de ensayo con pinzas y las raíces se lavaron con agua bidestilada estéril para quitar el medio

de cultivo sobrante. Seguidamente, las plántulas se sembraron en macetas de seis pulgadas de diámetro con medio de crecimiento (ver sección D de Materiales y Métodos) con la adición de aproximadamente 5% de vermiculita. A cada una de las macetas se les colocó un alambre en forma de campana y una bolsa de plástico transparente con agujeros para mantener alta la humedad relativa.

Los riegos se efectuaban con la solución nutritiva recomendada por Broughton y Dillworth, 1970 (Cuadro 5). Se prepararon cuatro soluciones madres que posteriormente se diluyeron en agua destilada. Se añadió una fuente rica en N y finalmente se reguló el pH.

Durante los primeros diez días de adaptación y durante toda la floración las plantas se regaron con solución nutritiva únicamente por la mañana. Al medio día y por la tarde se regaron con agua corriente al igual que en las otras etapas fenológicas del cultivo.

Cuando se notaba que un híbrido se había adaptado (crecía normalmente) se le quitaba la bolsa de plástico y el alambre, para colocarle varillas de bambú y sujetadores de alambre para mantenerlas erectas. Todos los fines de semana se realizaron aplicaciones preventivas de fungicidas e insecticidas.

Cuadro 5. Solución nutritiva (Broughton y Dillworth, 1970)^Z utilizada para regar^Y las plántulas F1 durante los primeros diez días de adaptación y la floración.

Solución madre	Elemento	Compuestos químicos	Cantidad ^X (g/L)
A	Ca	Ca Cl ₂ . 2H ₂ O	294.10
B	P	KH ₂ PO ₄	136.10
C	Fe	Citrato de hierro	6.70
	Mg	MgSO ₄ . 7H ₂ O	123.30
	K	K ₂ SO ₄	87.00
	Mn	MnSO ₄ . H ₂ O	0.338
D	B	H ₃ BO ₃	0.247
	Zn	Zn SO ₄ . H ₂ O	0.288
	Cu	Cu SO ₄ . 5H ₂ O	0.100
	Co	Co SO ₄ . H ₂ O	0.056
	Mo	Na ₂ MOO ₂ . 2H ₂ O	0.048

^Z Citados por Somasegaran y Hoben (1985).

^Y Para regar los híbridos F1 se diluyeron 5 ml de cada solución madre en 10 litros de agua destilada. Una vez diluidos, se concentró a 70 ppm de KNO₃ (0.05%) y se reguló el pH a 6.6 con Na OH 1N.

^X Cantidad de sales para preparar un litro de cada solución madre.

H. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1

La prueba de viabilidad de polen se realizó en todos los híbridos. Se cosecharon dos botones florales o flores recién abiertas por planta. La prueba se realizó con acetocarmín según el procedimiento descrito por Jensen (1962). Se extrajeron tres anteras y de cada una se observaron cinco campos visuales. Las anteras se colocaron por

cinco minutos sobre un vidrio de reloj que contenía tres a cuatro gotas de acetocarmín (carmín al 1% y 45% de ácido acético). Se puso una antera sobre un portaobjeto, se le agregó una gota de acetocarmín y se maceró. Se cubrió con un cubreobjeto tratando de no formar burbujas. Las observaciones se hicieron en un microscopio de luz con un aumento de 10X.

En las pruebas de viabilidad del polen se registraron las siguientes variables:

1. Número de granos de polen teñido (vivos)
2. Número de granos de polen no teñidos (muertos)

Con estos datos se calculó el porcentaje de fertilidad con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de fertilidad} = \frac{\text{Total de granos de polen teñidos}}{\text{Total de observaciones}} \times 100$$

I. Retrocruzas congruentes

Se retrocruzaron los híbridos F1 que florecieron con la variedad DOR 364 (*P. vulgaris*) como progenitor femenino. DOR 364 fue seleccionada como progenitor femenino por presentar las mejores características de crecimiento en el invernadero como buena germinación, buen crecimiento y floración abundante y constante. Se realizó el mayor número de cruzas posibles. Se utilizó una relación de 1 a 4 entre plantas masculinas y femeninas.

J. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza congruente (RC1)

Para aumentar la probabilidad de éxito en la obtención de plántulas provenientes de la primera retrocruza entre los F1 y *P. vulgaris* se efectuó de nuevo el rescate de embriones.

K. Adaptación de las RC1

El procedimiento para el transplante, la adaptación y las prácticas de cultivo y fitosanitarias de las plántulas RC1 fue similar al usado para las F1 (Sección D de Materiales y Métodos).

L. Pruebas de viabilidad de polen de las RC1

La prueba de viabilidad de polen de las RC1 se efectuó únicamente con un botón floral o flor recién abierta de algunas plantas, ya que florecían muy poco.

M. Autopolinización de RC1

El objetivo de esta fase fue la producción de semilla por autopolinización.

N. Retrocruzas congruentes del material proveniente del PIF

El 26 de marzo de 1994 se iniciaron las retrocruzas congruentes con materiales del PIF. En esta fase no se utilizó el rescate de embriones. Como plantas masculinas se

utilizaron materiales F2 de algunas RC1 y RC2. Como plantas femeninas se utilizaron DOR 364 y DOR 482¹ (*Pv*) y 89F-50-18 y 89F-50-19² (*Pa*) según el nivel de retrocruza en que se encontraban. Se utilizó una proporción de 1 a 4 entre plantas masculinas y femeninas. El siguiente esquema describe los procedimientos para la obtención del material F1 de RC2 y F1 de RC3.

(*Pa*) 89F-50-18 x 92-I1 (RC2)



94-I1 (RC3) (F1)

(*Pa*) 89F-50-18 x 92-I7A (RC2)



94-I7 (RC3) (F1)

(*Pa*) 89F-50-19 x 92-I7B (RC2)



94-I7 (RC3) (F1)

(*Pa*) 89F-50-19 x 92-I4 (RC1)



94-I4 (RC2) (F1)

(*Pv*) DOR 364 x 92-I4 (RC2)



94-I4 (RC3) (F1)

(*Pv*) DOR 364 x 92-I3 (RC2)



94-I3 (RC3) (F1)

¹ DOR 364 y DOR 482 de *P. vulgaris* fueron utilizados porque presentaron las mejores características de crecimiento en invernadero.

² 89F-50-18 y 89F-50-19 de *P. acutifolius* fueron utilizados porque presentaron buena adaptación, abundante floración y gran potencial de prendimiento en trabajos previos (Ortega, 1992)

(Pv) DOR 364 x 92-I5 (RC2)



94-I5 (RC3) (F1)

(Pv) DOR 482 x 92-I9 (RC2)



94-I9 (RC3) (F1)

(Pv) DOR 364 x 92-I1 (RC1)



94-I1 (RC2) (F1)

En algunos materiales se permitió la autopolinización para aumentar el número de semillas F2, ya que al momento de florecer las plantas masculinas RC1 y RC2, los progenitores femeninos ya habían florecido.

Ñ. Prueba de viabilidad de polen del material proveniente del PIF

A las plantas masculinas se les realizó la prueba de viabilidad de polen tomando una a dos flores por planta para observar la viabilidad del polen en otras generaciones.

O. Producción de semilla

La semilla que produjeron las retrocruzas congruentes fue cosechada por planta, se colocó en bolsas de papel y se guardó en un refrigerador a 4 °C hasta el momento de su utilización.

P. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con métodos que permitieron seleccionar los mejores cruces que tenían la más alta media y el mínimo de variancia del error para prendimiento, viabilidad de polen y número de semillas producidas.

Primero, los datos se sometieron a un análisis de variancia utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

en donde:

Y_{ij} = Cualquier observación de cualquier variable proveniente del 1^{ava} cruce.

U = Media común a todas las observaciones de las cruces.

T_i = Efecto debido al tratamiento.

E_{ij} = Efecto debido al error.

Los resultados significativos para cada planta femenina y masculina se sometieron a un nuevo análisis de variancia para determinar la aptitud general y específica de las variables de prendimiento, viabilidad del polen y número de semillas producidas. Se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = U + F_k + M_j + FM_{ij} + E_{ijk}$$

en donde:

U = Media común a todas las observaciones.

F_k = Efecto del k^{ava} planta femenina.

M_j = Efecto del j^{ava} planta masculina.

FM_{ij} = Efecto de la interacción entre la planta femenina y masculina.

E_{ijk} = Efecto debido al error.

Posteriormente, se determinó la variancia de las plantas femeninas, de las masculinas, de la interacción y del error utilizando el `proc varcomp method = mivqueo` disponible en SAS^R. Se hizo una prueba SNK (Student - Newman - Keuls) de separación de medias al 5% de probabilidad.

Se realizaron pruebas de correlación para las variables más importantes.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS^R (Statistical Analysis System) versión 6.04 (SAS^R, 1990 ab).

IV. RESULTADOS

A. Hibridación interespecífica entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Se realizaron un total de 3228 hibridaciones entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*. El máximo de cruza (379) se realizó con los genotipos DOR 364 x 89F-50-18. Con esta cruza se obtuvo uno de los porcentajes más altos (82%) de vainas llenas. En la cruza DOR 391 x 89F-50-19 se observó el porcentaje más alto de vainas llenas (85%) de un total de 220 cruza (Cuadro 6).

En el análisis de variancia para el prendimiento, se observaron diferencias significativas entre los genotipos de *P. acutifolius* utilizados como planta masculina ($P=0.0054$). No se observaron diferencias significativas en el prendimiento entre ninguno de los cuatro genotipos de *P. vulgaris* utilizados como planta femenina, independientemente del genotipo masculino utilizado. No hubo diferencias significativas ($P=0.5405$) en el prendimiento entre las combinaciones de genotipos *Pv* x *Pa* en la hibridación inicial (Cuadro 7).

En la prueba de separación de medias, la mejor línea de *P. acutifolius* en prendimiento fue 89F-50-19, independientemente del genotipo de *P. vulgaris* usado como madre (Cuadro 8).

La variancia del prendimiento fue mayor que las variancias del genotipo masculino, del genotipo femenino y de la interacción femenino por masculino (Cuadro 9).

Aproximadamente cinco días después de realizar las hibridaciones, en algunos cruces se observó que el ovario creció muy poco y las vainas se desprendieron de la planta madre. Antes de la caída estas vainas se arrugaron y se pusieron amarillas.

Cuadro 6. Porcentajes de prendimiento y características cuantitativas de las F1 entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Genotipos <i>Pv</i> x <i>Pa</i>	Total de cruzas rea- lizadas	Número de vainas de- sarrolladas	Porcentaje de vainas llenas	y Prendi- miento	Longitud de vainas (cm)		Diámetro de vainas (cm)	
					Promedio	Rango	Promedio	Rango
1 x 5 ^z	379	44	82	12	6.66	3.7- 9.5	0.71	0.4- 1.0
1 x 6	244	43	73	18	6.39	3.0-11.7	0.74	0.3-1.1
1 x 7	171	13	75	8	7.39	3.4-9.5	0.99	0.4-1.2
1 x 8	121	16	67	13	6.48	4.8-9.2	0.83	0.4-1.0
2 x 5	265	25	83	10	6.80	3.5-9.5	0.84	0.4-1.2
2 x 6	220	61	85	28	7.34	4.6-10.8	0.84	0.4-1.1
2 x 7	97	9	81	9	7.64	4.6-9.7	0.90	0.4-1.2
2 x 8	80	6	50	8	3.63	4.9-9.0	0.43	0.4-0.7
3 x 5	310	30	67	10	6.58	3.0-10.0	0.74	0.2-1.3
3 x 6	355	59	74	17	6.43	2.5-11.0	0.81	0.2-1.1
3 x 7	134	17	68	13	6.49	3.1-10.7	0.70	0.3-1.2
3 x 8	90	5	80	6	5.16	3.2-9.5	0.58	0.3-1.2
4 x 5	279	19	58	7	6.49	3.6-9.7	0.67	0.4-1.1
4 x 6	259	46	75	18	6.83	2.3-10.5	0.87	0.2-1.1
4 x 7	137	15	62	11	6.47	3.5-10.8	0.71	0.2-1.3
4 x 8	87	14	71	16	6.10	3.2-10.8	0.76	0.3-1.1
Promedio	202	26	72	13	6.43	2.30- 11.7	0.76	0.2- 1.3
Total	3228	422	-	-	-	-	-	-

^z Los números indican la identificación del genotipo utilizado

^y Porcentaje de prendimiento = número de vainas desarrolladas / número de cruzas x 100
realizadas

Cuadro 7. Análisis de la variancia del prendimiento en la hibridación interespecífica entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Plant femenina (<i>Pv</i>)	3	42.31	14.10	0.17	0.9192ns
Plant masculina (<i>Pa</i>)	3	1225.17	408.89	4.79	0.0054*
Femenina (<i>Pv</i>) x masculina (<i>Pa</i>)	9	683.87	75.99	0.89	0.5405ns
Error	48	4095.20	85.32		
Total	63	6046.56			

ns no significativo al 0.10 nivel de probabilidad.

Cuadro 8. Separación de medias del prendimiento en cruzas interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius* según los genotipos utilizados como plantas femeninas y masculinas.

Hembra (<i>Pv</i>)	Letra	Media	Macho (<i>Pa</i>)	Letra	Media
DOR 391	A	13.87	89F-50-19	A	20.43
DOR 364	A	13.04	F-0078	B	10.64
DANLI 46	A	12.92	A-80-10	B	10.24
DOR 482	A	11.06	89F-50-18	B	10.12

No se rescataron sus embriones ya que los óvulos no se habían desarrollado y aparecían secos y muy pequeños. Por otro lado, las vainas que continuaron con su desarrollo normal, se removieron de la planta para el rescate de embriones entre los ocho y 24 días después de las cruas (Cuadro 10). Estas vainas eran normales, de color verde. Sin embargo, en general fueron cortas y angostas (su longitud promedio fue de 6.43 cm y su diámetro de 0.76 cm) (Cuadro 6 y Fig. 1) comparadas con las vainas autofecundadas de los genotipos de *P. vulgaris* de esa misma edad (longitud y diámetro promedio de 10.0 cm y 1.1 cm.) utilizados como madre.

Cuadro 9. Componentes de la variancia del prendimiento en las cruas interespecíficas entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.

Componente de variancia	Prendimiento
Variancia planta femenina (<i>Pv</i>)	- 3.87
Variancia planta masculina (<i>Pa</i>)	20.77
Variancia planta femenina x masculina	-2.33
Variancia error	85.32

B. Rescate de embriones

En general, entre los ocho y 24 días después de la hibridación se realizó el rescate de embriones. Se observó un promedio de tres semillas grandes por vaina (Cuadro 10). Durante la disección se observó que la mayoría de las semillas se encontraban en el centro de la vaina y fueron de las que se rescataron los embriones con mayor facilidad.



Fig. 1 Entre los ocho y 24 días después de la hibridación se removieron las vainas de la planta madre. Nótese el pequeño tamaño de la vaina.

Cuadro 10. Promedios y rangos de días desde la cruce hasta el rescate, semillas por vaina y embriones rescatados por vaina.

Genotipo	Promedio de días desde la cruce hasta el rescate	z	Semillas por vaina		Porcentaje de embriones rescatados por vaina	
			y	x		
Promedio	Rango	Promedio	Rango	Promedio	Rango	
1 x 5	16	8 24	2.69	0 - 5	66.09	0 - 5
1 x 6	9	9 24	2.68	0 - 6	79.25	0 - 5
1 x 7	14	8 20	2.63	0 - 6	83.04	0 - 5
1 x 8	14	9 24	3.12	0 - 6	68.29	0 - 5
2 x 5	14	8 21	2.63	0 - 5	72.75	0 - 4
2 x 6	14	8 24	2.81	0 - 6	78.62	0 - 6
2 x 7	15	11 19	2.63	0 - 6	71.43	0 - 5
2 x 8	13	11 16	1.50	0 - 3	33.34	0 - 2
3 x 5	17	8 23	2.34	0 - 5	56.11	0 - 5
3 x 6	16	9 24	2.00	0 - 5	80.04	0 - 4
3 x 7	16	10 23	2.60	0 - 6	79.76	0 - 5
3 x 8	15	10 21	2.00	0 - 5	70.00	0 - 5
4 x 5	16	8 24	2.03	0 - 5	72.30	0 - 5
4 x 6	16	8 24	2.69	0 - 6	57.82	0 - 5
4 x 7	16	11 21	2.14	0 - 6	46.50	0 - 6
4 x 8	15	9 21	2.67	0 - 6	75.92	0 - 5
Promedio	16	8 24	2.79	0 - 6	68.20	0 - 6

z

Rango de días desde la hibridación hasta el rescate de embriones.

y

Rango de embriones rescatados por vaina.

x

Rango de semillas contenidos por vaina

La mayoría de los embriones rescatados de los híbridos F1 presentaron características diferentes comparados con los provenientes de vainas autofecundadas de *P. vulgaris*. Entre estas características atípicas se observó la forma ovoide de los cotiledones, la radícula agrandada en relación con los cotiledones y cotiledones de diferente tamaño en un mismo embrión (Fig. 2).



Fig. 2 Crecimiento de embriones híbridos provenientes de cruza interespecíficas entre *Pv* y *Pa*. De izquierda a derecha se muestra la forma ovoide de los cotiledones, la radícula agrandada en relación con los cotiledones, la diferencia en el tamaño de los cotiledones en un mismo embrión y el crecimiento de la radícula y del tallo.

La cruza DOR 364 x F-0078 tuvo el mayor promedio de semillas por vaina (3.12). De igual manera, la cruza DOR 391 x 89F-50-19 tuvo un promedio de 2.81, que fue superior a la media (2.79), mientras que la cruza DOR 391 x A-80-10 presentó el menor promedio de semillas por vaina (1.50) (Cuadro 10).

No hubo correlación ($P = 0.2336$ y $P = 0.6262$) entre los días desde la cruza hasta el rescate y la longitud de la vaina y el número de semillas por vaina. Hubo una correlación lineal significativa ($P = 0.0001$) entre la longitud de la vaina y el número de semillas por vaina (Cuadro 11).

Algunos embriones estaban arrugados o tan pequeños que fue difícil manipularlos en el momento de realizar el cultivo *in vitro*. Por esta razón, sólo se cultivaron los que medían 1 mm o más.

Cuadro 11. Correlación entre la longitud de la vaina, el número de semillas por vaina y los días después de la cruza hasta el rescate de embriones F1.

Variable	Correlación (r)	Probabilidad
Longitud de la vaina vrs. número de semillas por vaina	0.65	0.0001*
Longitud de la vaina vrs. días desde la cruza hasta el rescate	-0.15	0.2336ns
Número de semillas por vaina vrs. días desde la cruza hasta el rescate	-0.06	0.6262ns

(r) = Coeficiente de correlación de Pearson

* significativo al 0.01 nivel de probabilidad

Se observaron diferencias en el tamaño de los embriones híbridos ($P_v \times P_a$) en relación con los embriones normales (autopolinizados) de *P. vulgaris* estudiados en ensayos preliminares. Dieciséis días después de la hibridación, los embriones F1 ($P_v \times P_a$) tenían alrededor de un tercio del tamaño de un embrión de P_v autopolinizado normal. Los embriones híbridos eran blancos y los del frijol común verdes (Fig. 3).



Fig. 3 Embrión normal de P_v , grande y verde y embrión F1 ($P_v \times P_a$), pequeño y blanco, rescatados 16 días después de la hibridación. Escala 1: 4.

Se rescataron 68% de los embriones (Cuadro 10), los demás fueron tan pequeños (aproximadamente 0.5 mm) que se dañaron al momento de la extracción. De los embriones cultivados, la mitad crecieron (52%) (Cuadro 12), los demás no desarrollaron. En algunos, únicamente se observó crecimiento radicular, en otros, el desarrollo del tallo y de las hojas. Después de un tiempo las plántulas sin raíces murieron (Fig. 4).

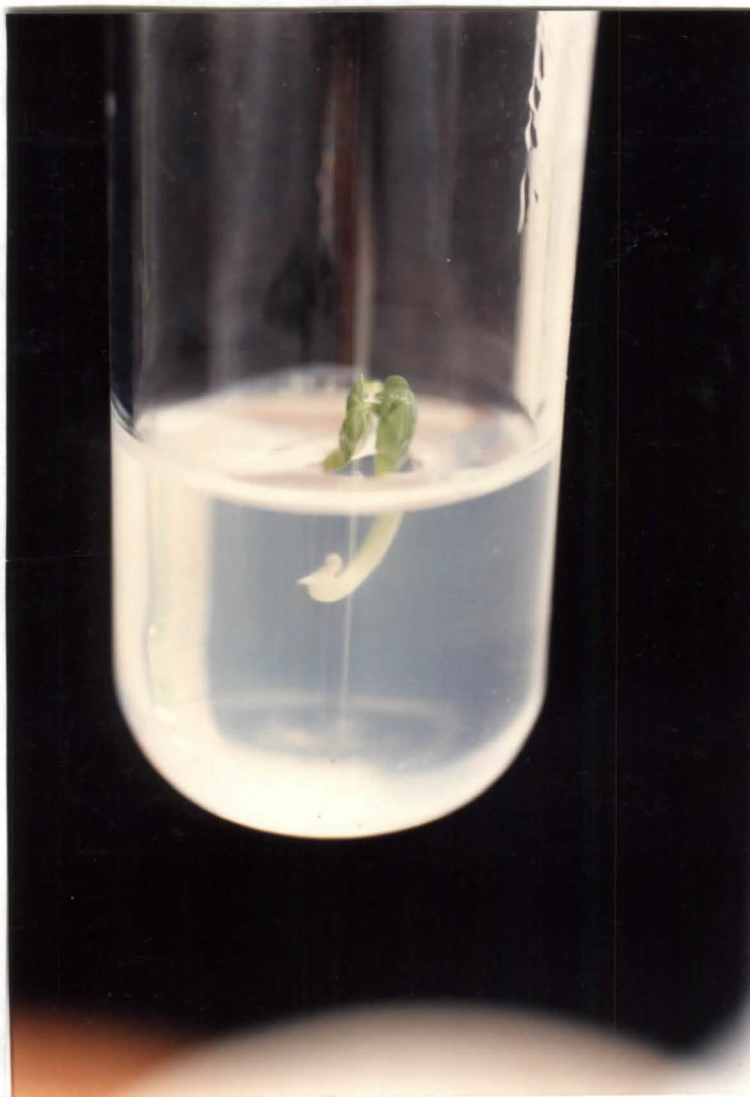


Fig. 4 Plántula híbrida (*Pv* x *Pa*) 15 días después del rescate. Se observa el desarrollo del tallo y las hojas primarias. La radícula no desarrolló.

Cuadro 12. Promedios y rangos de algunas características de los embriones y las plántulas F1 transplantadas.

Embrión híbrido F1	Embriones		Plántulas F1 transplantables									
	cultivados	desarrollados (%)	RAICES		TALLO				HOJAS			
			promedio	z	Hipocotilo		Epicotilo		Simples	w	Trifololiadas	v
					promedio	y	promedio	x				
			(cm)	Rango	(cm)	Rango	(cm)	Rango		Rango		Rango
RP-15	78	42.31	5	1.5 - 8.0	5	1.0 - 9.0	2	0.5 - 5.0	2	1.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-16	102	55.00	4	0.5 - 9.0	4	1.0 - 10	3	0.5 - 5.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 2.0
RP-17	43	51.16	4	0.5 - 9.0	4	1.0 - 8.0	2	0.5 - 5.0	1	0.0 - 2.0	0	0.0 - 0.0
RP-18	28	42.86	4	1.0 - 7.0	4	0.5 - 8.0	2	0.5 - 5.0	2	1.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-25	60	53.33	4	2.0 - 6.0	4	0.5 - 8.0	3	0.5 - 6.0	1	0.0 - 2.0	0	0.0 - 2.0
RP-26	111	55.86	4	0.5 - 8.0	3	0.5 - 9.0	3	0.5 - 7.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-27	28	67.86	3	1.5 - 10	3	0.5 - 7.0	2	0.5 - 7.0	1	0.0 - 2.0	0	0.0 - 2.0
RP-18	8	62.50	1	0.0 - 3.0	1	0.5 - 2.0	0.5	0.5 - 0.5	1	0.0 - 2.0	0	0.0 - 0.0
RP-35	61	54.10	4	2.0 - 8.0	4	1.0 - 9.0	2	0.5 - 6.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-36	95	52.63	4	2.0 - 8.0	4	1.0 - 8.0	3	0.5 - 5.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-37	43	48.84	3	2.0 - 6.0	3	2.0 - 4.0	7	0.5 - 6.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-38	12	50.00	2	0.0 - 4.0	2	2.0 - 4.0	2	2.0 - 3.0	1	0.0 - 2.0	0	0.0 - 1.0
RP-45	46	54.35	5	1.5 - 10	3	0.5 - 9.0	3	0.5 - 6.0	2	1.0 - 2.0	0	0.0 - 0.0
RP-46	108	59.26	4	2.0 - 12	9	0.5 - 9.0	5	1.0 - 6.0	2	0.2 - 2.0	0	0.0 - 2.0
RP-47	44	40.91	5	1.0 - 12	4	1.0 - 9.0	3	0.5 - 7.0	2	0.2 - 2.0	0	0.0 - 2.0
RP-48	23	34.78	3	1.0 - 4.0	3	0.5 - 4.0	2	1.5 - 3.0	2	0.2 - 2.0	0	0.0 - 1.0
Promedio	49	51.61	4	0.5 - 10	1	0.5 - 10	3	0.5 - 7.0	2	0.0 - 2.0	0	0.0 - 2.0
Total	790	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

z

Rango de raíces en centímetros

y

Rango del hipocotilo en centímetros

x

Rango del epicotilo en centímetros

w

Rango de hojas simples

v

Rango de hojas trifololiadas

Los embriones incubados en condiciones de oscuridad desarrollaron el sistema radical y posteriormente el inicio de la elongación de los tallos. Los tallos midieron entre 0.5 y 12 cm. El sistema radical y los tallos eran de color blanco cremoso. El sistema radical se desarrolló entre el tercero y el décimo días después del rescate. A partir de la raíz principal, que medía entre 1.5 y 2.5 cm, se produjeron raíces secundarias (Fig. 5).



Fig. 5 Plántula híbrida (*Pv x Pa*) cinco días después del rescate. La raíz medía aproximadamente 2.5 cm y el tallo 1 cm de longitud.

Después de que los cultivos se colocaron bajo la luz, se tornaron de color verde y continuaron su desarrollo. Finalmente, se observó el desarrollo de las hojas primarias y trifolioladas. Los tallos, de apariencia delgada y débil, midieron de 0.5 a 10 cm en el hipocótilo y de 0.5 a 7 cm en el epicótilo (Fig. 6 y Cuadro 12).



Fig. 6 Plántula híbrida (*Pv x Pa*) antes del trasplante, 20 días después del rescate. Se puede notar el tallo delgado de apariencia débil y una hoja trifoliolada pequeña. Su sistema radical presenta la raíz principal y raíces secundarias.

Algunas plántulas produjeron las dos hojas primarias normalmente, sin embargo, otras no produjeron ninguna, lo que también sucedió con las hojas trifolioladas (Cuadro 12). Tanto las hojas primarias como las trifolioladas, mostraron una coloración verde normal (Fig. 7).

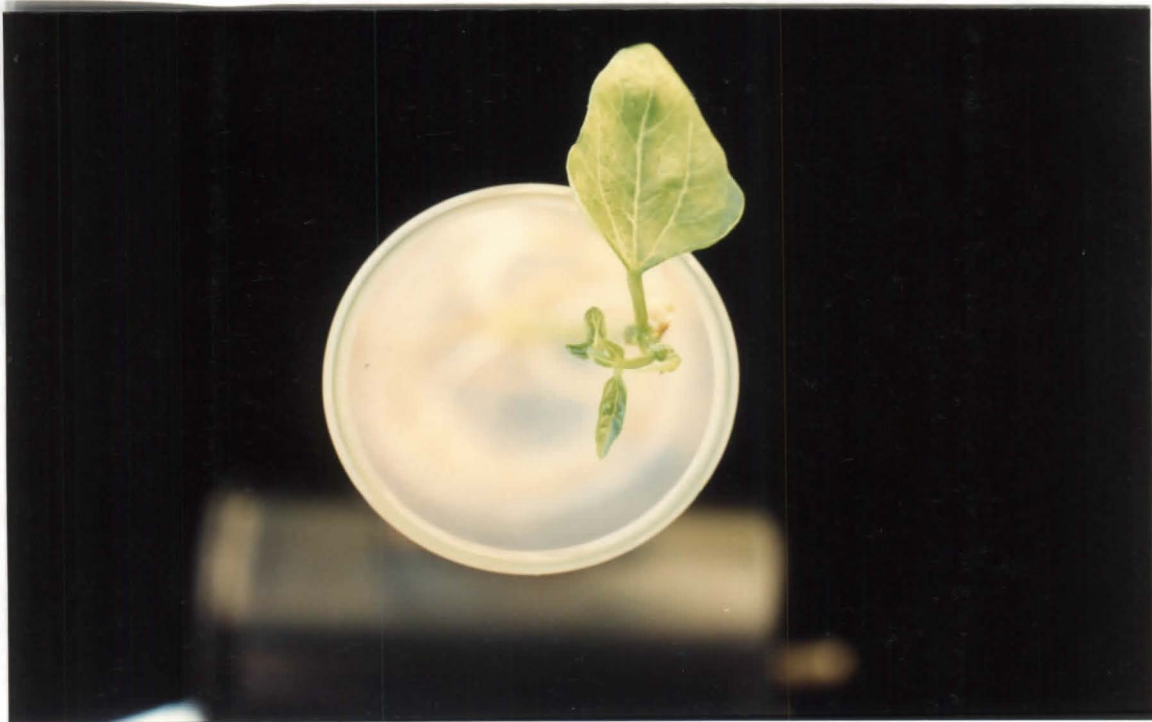


Fig. 7 Plántula al momento del trasplante, que muestra una hoja primaria entera y una trifoliolada. Escala 2:1.

C. Transplante y adaptación de los híbridos F1

Se transplantaron un total de 376 plántulas F1 entre los ocho y 21 días después del rescate (Cuadro 13).

Durante el periodo de adaptación se observó estrés en todos los híbridos debido al cambio de ambiente. Las hojas se cayeron y algunas plántulas murieron. En algunas plántulas los puntos de crecimiento del tallo principal murieron, sin embargo, produjeron ramas laterales a partir de yemas del nudo cotiledonar (Fig. 8).



Fig. 8 Plántula F1 (*Pv* x *Pa*) mostrando ramas desarrolladas a partir de yemas en el nudo cotiledonar. Nótese que la yema apical del tallo principal ha muerto.

Cuadro 13. Promedios, rangos y porcentajes de días desde el rescate hasta el transplante, F1 que florecieron y fertilidad del polen observados en las plantas F1 provenientes de cruces interespecíficos entre *Pv* y *Pa*.

Híbrido	Promedio de días desde el rescate al transplante	Rango	Total de plantas trans-plantables	Porcentaje de plantas F1 que florecieron	Promedio del porcentaje de fertilidad de plantas F1	Rango
RP-15	16	13-21	32	87.50	21.23	19.7-23.3
RP-16	15	8.0-21	55	100.00	20.31	18.6-23.2
RP-17	17	13-21	17	82.35	5.61	2.0-11.7
RP-18	16	13-21	11	18.18	13.33	6.3-22.3
RP-25	17	13-21	26	26.92	13.88	11.2-18.6
RP-26	15	13-20	45	33.33	11.7	8.7-13.9
RP-27	17	17-19	19	47.37	14.65	7.4-18.5
RP-28	6	19-19	2	50.00	26.28	26.2-26.2
RP-35	15	8.0-20	27	37.04	13.41	2.7-12.0
RP-36	15	13-20	34	50.00	22.07	18.5-24.4
RP-37	16	13-21	14	21.43	14.54	8.7-20.3
RP-38	10	16-16	4	75.00	20.52	17.9-23.0
RP-45	17	8.0-20	19	36.84	13.93	3.4-26.8
RP-46	16	12-18	46	45.65	20.24	18.5-21.2
RP-47	15	12-19	18	61.11	16.79	9.2-24.4
RP-48	16	12-19	7	42.86	16.47	9.5-27.9
Promedio Total	15	8-21	24	50.97	17	2.0-27.9
	-	-	376	-	-	-

z

Rango de días desde el rescate de embriones hasta el transplante.

y

Mínimo y máximo de fertilidad del polen en las plantas F1, en porcentaje.

En los híbridos RP-26 y RP-36 se rescataron el mayor número de embriones (79% y 78%) (Cuadro 13). Se obtuvo una correlación lineal significativa ($P = 0.0001$) entre el número de embriones rescatados y el número de plantas transplantables (Cuadro 14)

Las plántulas F1 que continuaron su desarrollo alcanzaron una altura entre 10 y 35 cm, mientras que las plantas de los genotipos de *P. vulgaris* y *P. acutifolius* alcanzaron una longitud entre 40 y 95 cm (Fig. 9).



Fig. 9 De izquierda a derecha se muestra el tamaño de las plantas del *P. vulgaris* (izquierda), el híbrido F1 (centro) y del *P. acutifolius* (derecha) durante la etapa de floración. Se puede notar la pequeña altura del híbrido F1, aproximadamente de 20 cm.

Las F1 descendientes de DOR 364, DOR 391 y DOR 482 tuvieron un hábito de crecimiento indeterminado arbustivo en todas las cruzas, similar al de sus progenitores. Por otro lado, las F1 provenientes de DANLI 46 presentaron un crecimiento indeterminado, similar al de su progenitor femenino.

En todas las plantas híbridas F1 se observaron características intermedias entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*. En algunas plantas se observaron hojas trifolioladas de forma redondeada y triangular, similar al progenitor de *Pv*. En otras plantas se observaron folíolos de forma redondeada, lanceolada y ovoide- lanceolada, similar a su progenitor de *Pa* (Fig. 10).



Fig. 10 Morfología de las hojas del híbrido F1 (*Pv* x *Pa*) en la etapa de floración. Nótese en la hoja trifoliolada (en la parte inferior izquierda) el folíolo terminal de forma redondeada y en la parte central (inferior y superior) folíolos lanceolados y ovoide-lanceolados, similares al del progenitor de *Pa*.

En algunas plantas híbridas F1, se observaron los folíolos unidos en una misma hoja trifoliolada, dando la apariencia de una hoja simple palmada. De igual manera, se observaron folíolos extra. Las hojas de los híbridos tenían puntos y manchas de color amarillo y blanco sobre la superficie del haz de la hoja (Fig. 11).

Los híbridos F1 florecieron aproximadamente a los 25 días después del transplante. En general, se observaron entre una y nueve flores por planta. Algunas produjeron flores de menor tamaño que las de sus progenitores; sin embargo, la mayoría las produjeron similares, en tamaño y forma, al progenitor *P. acutifolius*.

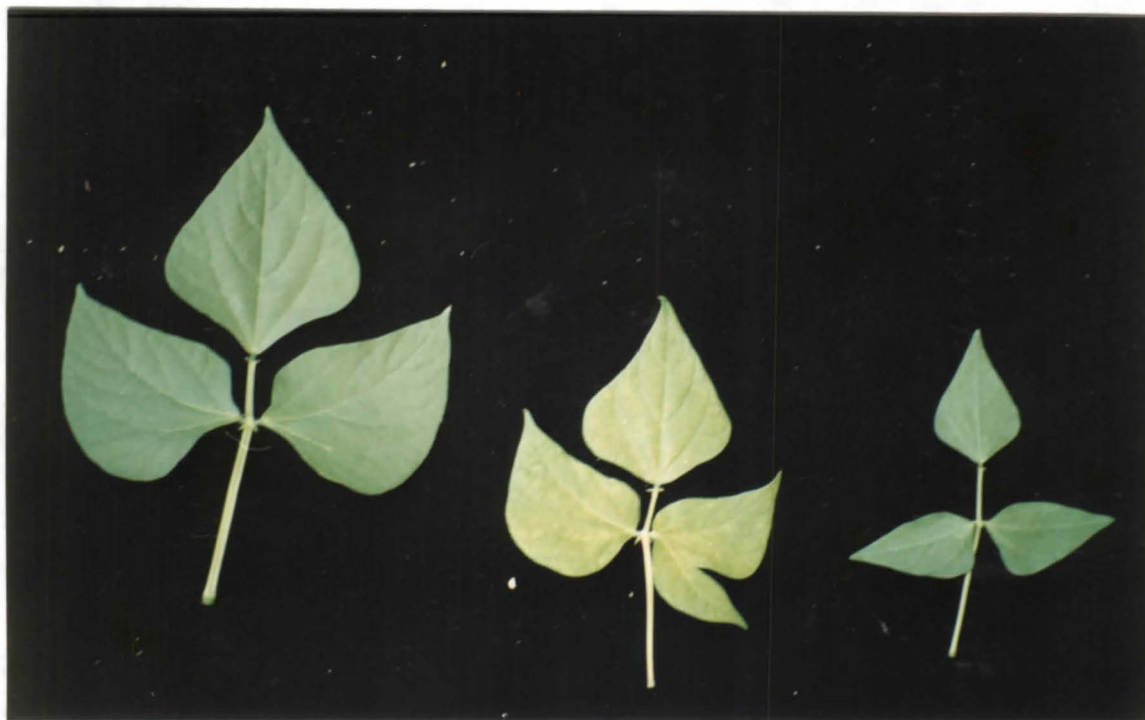


Fig. 11 Hojas trifolioladas de *Pv* (izquierda), híbrido F1 (*Pv* x *Pa*) (centro) y de *Pa* (derecha) en la etapa de floración.

Cuadro 14. Correlaciones entre el número de embriones F1 rescatados y el número de plántulas F1 transplantables.

Variables		Correlación (r)	Probabilidad
Número de embriones rescatados	vrs. número de plantas transplantables	0.75	0.0001*

(r) Coeficiente de correlación de Pearson

* significativo al 0.01 nivel de probabilidad

Las flores de los híbridos F1 permanecieron abiertas por dos o tres días. Algunas se secaron y desprendieron del pedúnculo y las otras se utilizaron para polinizar al genotipo de *Pv* en la fase de retrocruzas.

Las flores de todos los genotipos utilizados como progenitores femeninos (*Pv*) son de color blanco. En las líneas de *Pa* las flores eran blancas, a excepción del 89F-50-19 que produce flores de color lila en ciertas plantas (Fig. 12) y en otras blancas con tintes lila.

Los híbridos provenientes de cruzas con el 89F-50-19, produjeron características intermedias en la morfología de la hoja, y flores de color lila en unas plantas y en otras de color blanco con tintes lila (Fig. 12).

Las vainas de las dos especies utilizadas como progenitores fueron rectas o con una ligera curvatura longitudinal. Sin embargo, transversalmente, los genotipos de *Pv* presentaron vainas de forma ovoide y los de *Pa* aplanadas. La mayoría de los híbridos F1 produjeron vainas similares al progenitor *Pv* (Fig. 12).

De todas las plántulas transplantables, solamente la mitad florecieron (51%) (Cuadro 13). La mayoría de los híbridos en los que DOR 364 estaba involucrado, presentaron los mayores porcentajes promedios de plantas que florecieron. Entre ellas, la RP-16 floreció en un 100%. Sin embargo, la RP-18 (que desciende de DOR 364) tuvo el porcentaje más bajo (18%). Por otro lado, el híbrido RP-26, a pesar de que produjo un alto número de plántulas transplantables (45), solamente un 33% de éstas florecieron.



Fig. 12 Nótese, de izquierda a derecha, la flor de color lila (89F-50-19); flor blanca (híbrido RP-15), flor blanca con tintes de color lila (híbrido RP-26) y flor blanca (DOR 391). Las vainas del híbrido, similares a las de *Pv*.

D. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1

En los híbridos F1 en los cuales se produjeron pocas flores se realizó la prueba de viabilidad del polen únicamente en una flor. Las otras se dejaron en las plantas madres para ser utilizadas en las retrocruzas.

La quilla, las alas y los filamentos de los estambres eran delicados y débiles. Al momento de la manipulación se dañaron varias flores. El poco polen en las anteras parecía contraído o vacío. Algunos estambres no produjeron anteras, únicamente filamentos.

El porcentaje de fertilidad del polen de los híbridos F1 varió en un rango de 2 a 28% (Cuadro 13).

La variancia del error para la fertilidad del polen fue alta (46.93), mayor que para la variación de la fertilidad del polen en los híbridos F1 (4.60) (Cuadro 15).

No se observaron diferencias significativas en la fertilidad del polen de los híbridos F1 ($P = 0.2633$) (Cuadro 16).

Cuadro 15. Componentes de la variancia de la variable fertilidad del polen en las retrocruzas entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

Componente de variancia	Fertilidad del polen
Variancia planta femenina (DOR 264)	-
Variancia planta masculina (híbrido F1)	4.60
Variancia planta femenina x planta masculina	-
Variancia error	46.93

Cuadro 16. Análisis de variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	5	907.96	60.53	1.30	0.2633ns
Planta masculina (F1)	15	907.96	60.53	1.30	0.2633ns
Error	28	1299.39	46.41		
Total	43	2207.35			

ns = no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

E. Retrocruzas congruentes

Se realizaron 748 hibridaciones entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

En las retrocruzas congruentes, las características de las vainas desarrolladas, las vainas llenas y el prendimiento se evaluaron de la misma manera que en las F₁.

El máximo de retrocruzas (167) se realizó con DOR364 x RP-16, y produjeron uno de los porcentajes más altos (79%) de vainas llenas. Otras retrocruzas sobresalientes fueron DOR 364 x RP-26 y DOR 364 x RP-36, en las que se realizaron 49 y 52 hibridaciones, que produjeron 100% de vainas llenas, además de altos porcentajes de prendimiento (18% y 20%, respectivamente). Aproximadamente 14 días después de la hibridación, las vainas medían entre 3.5 y 9.2 cm de largo y entre 0.5 y 1.3 de diámetro (Cuadro 17).

Cuadro 17. Porcentajes de prendimiento y características cuantitativas de las RC1 (DOR 364 x híbrido F1).

Retrocruza (RC1)	Total de retrocruzas realizadas	Número de vainas desarrolladas	Porcentaje de vainas llenas	y Prendimiento	Longitud de vainas (cm)		Diámetro de vainas (cm)	
					Promedio	Rango	Promedio	Rango
DOR 364 x RP-15	67	9.00	75.00	13	7.59	7.5- 7.7	0.85	0.5- 1.0
DOR 364 x RP-16	167	23.00	79.00	14	7.16	5.9- 7.8	0.90	0.5- 1.2
DOR 364 x RP-17	62	13.00	93.00	21	6.60	6.4- 6.9	0.82	0.5- 1.2
DOR 364 x RP-18	17	35.00	100.00	6	9.10	9.1- 9.1	1.20	1.2- 1.2
DOR 364 x RP-25	22	0.00	0.00	0	-	-	-	-
DOR 364 x RP-26	49	9.00	100.00	18	7.74	7.2- 8.2	0.96	0.6- 1.2
DOR 364 x RP-27	39	1.00	100.00	3	8.30	8.3- 8.3	1.00	1.0- 1.0
DOR 364 x RP-28	5	0.00	0.00	0	-	-	-	-
DOR 364 x RP-35	44	5.00	100.00	11	5.91	3.5- 8.2	0.98	0.7- 1.3
DOR 364 x RP-36	56	11.00	100.00	20	6.95	4.4- 8.2	0.98	0.5- 1.2
DOR 364 x RP-37	26	31.00	66.67	8	6.25	6.2- 6.2	0.80	0.5- 1.1
DOR 364 x RP-38	36	3.00	100.00	8	8.90	8.6- 9.2	1.00	0.9- 1.1
DOR 364 x RP-45	16	2.00	100.00	13	5.40	5.4- 5.4	0.80	0.5- 1.0
DOR 364 x RP-46	50	9.00	69.23	18	5.94	4.2- 7.4	0.90	0.5- 1.1
DOR 364 x RP-47	70	8.00	80.00	11	6.44	5.8- 7.0	0.77	0.5- 1.2
DOR 364 x RP-48	22	1.00	50.00	5	6.00	6.0- 6.0	1.00	1.0- 1.0
Promedio	47	10.00	76.00	11	7.00	3.5- 9.2	0.93	0.5- 1.3
Total	748	160.00	-	-	-	-	-	-

z

Los números indican la identificación del genotipo utilizado

y

Porcentaje de prendimiento = número de vainas desarrolladas / número de cruas realizadas x 100

La variancia del error para el prendimiento fue alta (317.23), mayor que para la variación de los híbridos F1 (92.30) (Cuadro 18).

Cuadro 18. Componentes de la variancia del prendimiento en las retrocruzas entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

Componente de variancia	Prendimiento
Variancia planta femenina (DOR 364)	-
Variancia planta masculina (híbrido F1)	92.30
Variancia planta femenina x planta masculina	-
Variancia error	317.23

En el análisis de variancia para el prendimiento no se observaron diferencias significativas en el genotipo de *P. vulgaris* (DOR 364) utilizado como planta femenina y los híbridos F1 (Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de la variancia del prendimiento en las retrocruzas entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Planta masculina (F1)	15	110.98	7.40	1.17	0. 3239 ns
Error	48	302.75	6.30		
Total	63	413.73			

ns = no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

F. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza (RC1)

El rescate de embriones se realizó entre los seis y 24 días después de la hibridación. El promedio de semillas por vaina fue 1.14. Las retrocruzas DOR 364 x RP-16 y DOR 364 x RP-36, presentaron el mayor número de semillas por vaina (2.25). En la retrocruza DOR 364 x RP-26 el promedio fue superior (2.0) a la media (1.14) (Cuadro 20).

Todos los embriones RC1 (DOR 364 x F1) presentaron características similares a las observadas en los embriones F1. Se rescataron 31% de los embriones; los demás se dañaron al momento de la extracción. Los mayores promedios de embriones rescatados correspondieron a las retrocruzas DOR 364 x RP-45 y DOR 364 x RP-26 (50% y 37%), mientras que los menores fueron para las retrocruzas DOR 364 x RP-38 y DOR 364 x RP-16 (20 y 14%) (Cuadro 20).

En general, de los embriones cultivados, únicamente la mitad (50%) crecieron, los demás murieron. La RC1 más sobresaliente fue la cruce de DOR 364 x RP-26, en la que se desarrollaron un 74% de los embriones. En la retrocruza DOR 364 x RP-48 se desarrolló el único embrión cultivado. El promedio de longitud de las raíces, el hipocótilo y el epicótilo fue de 2 cm, 2 cm y 3 cm, respectivamente. Algunas plántulas produjeron las dos hojas primarias normalmente, sin embargo, otras produjeron solamente una. Algunas plántulas no desarrollaron hojas trifolioladas, pero en otras se produjeron hasta dos hojas trifolioladas (Cuadro 21).

Se obtuvo una correlación lineal significativa ($P = 0.0001$) entre la longitud de la vaina y el número de semillas por vaina. Por otro lado, no hubo correlación entre los días desde la retrocruza hasta el rescate de los embriones RC1 y la longitud de las vainas y el número de semillas por vaina (Cuadro 22).

Cuadro 20. Porcentajes y rangos de días desde la retrocruza hasta el rescate de embriones, semillas por vaina y embriones rescatados por vaina.

Retrocruza (RC1)	Promedio de días desde retrocruza hasta el rescate	Rango ^z	Semillas por vaina ^y		Porcentaje de embriones rescatados por vaina ^x	
			Promedio %	Rango	Promedio	Rango
DOR 364 x RP-15	15	6.0- 23	1.75	0.0- 3.0	20.00	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-16	16	8.0- 24	2.25	0.0- 4.0	14.29	0.0- 4.0
DOR 364 x RP-17	13	7.0- 24	1.75	0.0- 6.0	29.17	0.0- 6.0
DOR 364 x RP-18	13	13- 13	0.75	0.0- 3.0	33.33	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-25	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-26	14	6.0- 21	2.00	1.0- 5.0	36.84	1.0- 5.0
DOR 364 x RP-27	6	6.0- 6.0	1.00	0.0- 4.0	33.33	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-28	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-35	19	10- 24	2.00	0.0- 3.0	37.50	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-36	17	10- 24	2.25	0.0- 6.0	34.62	0.0- 6.0
DOR 364 x RP-37	10	8.0- 12	0.25	0.0- 4.0	33.33	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-38	13	12- 16	1.25	0.0- 4.0	20.00	0.0- 2.0
DOR 364 x RP-45	15	11- 18	1.00	0.0- 2.0	50.00	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-46	18	8.0- 24	1.00	0.0- 3.0	25.00	0.0- 3.0
DOR 364 x RP-47	13	8.0- 18	0.75	0.0- 2.0	27.27	0.0- 2.0
DOR 364 x RP-48	13	13- 13	0.25	1.0- 1.0	33.33	1.0- 1.0
Promedio	14	6.0- 24	1.14	0.0- 6.0	30.57	0.0- 6.0

z

Rango de días desde la hibridación hasta el rescate de embriones

y

Rango de embriones rescatados por vaina

x

Rango de semillas contenidos por vaina

Cuadro 21. Promedios y rangos de algunas características cuantitativas de los embriones y las plántulas RC1 transplantadas.

Embrión (RC1)	Embriones		Plántulas RC1 transplantables									
			RAICES		TALLO				HOJAS			
	cultivados	desarrollados (%)	promedio	z	Hipocótilo		Epicótilo		Simples	Trifolioladas		
					promedio	y	promedio	x		w	v	
			(cm)	Rango	(cm)	Rango	(cm)	Rango		Rango		Rango
DOR 364 x RP-15	24	50.00	3	2.0- 5.0	3	1.0- 6.0	2	1.0- 3.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 2.0
DOR 364 x RP-16	35	37.14	2	1.0- 2.0	3	2.0- 5.0	2	1.0- 3.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 0.0
DOR 364 x RP-17	24	54.17	1	1.0- 1.0	5	0.5- 6.0	4	3.0- 4.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 0.0
DOR 364 x RP-18	3	33.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-26	19	73.68	2	1.0- 4.0	3	1.0- 4.0	2	0.5- 3.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-27	3	33.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-35	8	37.50	2	2.2- 2.0	2	2.0- 2.0	1	1.0- 1.0	1	1.0- 1.0	0	0.0- 0.0
DOR 364 x RP-36	26	46.15	3	2.0- 4.0	2	1.0- 3.0	2	1.0- 3.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-37	3	33.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-38	5	40.00	2	2.0- 3.0	2	1.0- 2.0	2	1.0- 2.0	2	2.0- 2.0	1	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-45	2	50.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOR 364 x RP-46	16	42.31	2	1.0- 3.0	3	1.0- 5.0	3	1.0- 3.0	2	1.0- 2.0	0	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-47	11	63.64	3	2.0- 5.0	5	2.0- 9.0	5	1.0- 3.0	2	1.0- 2.0	0	0.0- 1.0
DOR 364 x RP-48	1	100.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Promedio	13	49.61	2	1.0- 5.0	2	0.5- 9.0	3	0.5- 4.0	1	1.0- 2.0	0	0.0- 2.0
Total	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

z

Rango de raíces en centímetros

y

Rango del hipocótilo

x

Rango del epicótilo en centímetros

w

Rango de hojas simples

v

Rango de hojas trifolioladas

Cuadro 22. Correlaciones entre la longitud de la vaina, el número de semillas por vaina y los días después de la retrocruza hasta el rescate de los embriones RC1.

Variables	Correlación (r)	Probabilidad
Longitud de vaina vrs. número de semillas por vaina	0.74	0.0001**
Longitud de vaina vrs. días desde la cruza hasta el rescate	-0.002	0.9889ns
número de semillas por vaina vrs. días desde la cruza hasta el rescate	0.016	0.9279ns

(r) Coeficiente de correlación de Pearson

** significativo al 0.01 nivel de probabilidad

ns no significativo al 0.01 nivel de probabilidad

En el análisis de variancia para el número de semillas por vaina no se observaron diferencias significativas ($P = 0.4375$) (Cuadro 23).

Cuadro 23. Análisis de la variancia del número de semillas por vaina en las retrocruzas entre *P. vulgaris* (DOR 364) y los híbridos F1.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	12	10.25	0.85	1.06	0.4375ns
Planta femenina (P_v)	12	10.25	0.85	1.06	0.4375ns
Error	19	15.25	0.80		
Total	31	25.50			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

G. Transplante y adaptación de las RC1

Se transplantaron 46 plántulas RC1 entre los siete y 23 días después del rescate (Cuadro 24).

La mayoría de las RC1 (DOR 364 x F1) presentaron características similares de crecimiento y morfología de la planta a los observados en los híbridos F1 (Fig. 13); sin embargo, también se observaron algunas plantas RC1 similares al *P. vulgaris* (línea DOR 364), utilizado como planta femenina.



Fig. 13 Planta RC1-RP26 en periodo de floración. Nótese en la hoja trifoliolada (parte superior derecha y parte inferior izquierda) el foliolo terminal de forma triangular similar al del progenitor *Pv*.

Cuadro 24. Promedios, rangos y porcentajes de días desde el rescate hasta el transplante, RC1 que florecieron y fertilidad de polen observados en las plantas RC1.

Plantas (RC1)	Promedio de días desde el rescate al transplante	Rango	Total de plantas RC1 transplantes	Porcentaje de plantas RC1 que florecieron	Porcentaje de fertilidad Plantas RC1	Rango	Número de semillas pro-ducidas por planta (RC1)	Total de semillas pro-ducidas (RC1)
RC1-RP15	10	7 23	9	66.67	55.89	37.5- 80.0	6.83	41
RC1-RP16	10	7 16	6	66.67	40.13	28.5- 50.0	6.67	34
RC1-RP17	7	7 16	5	40.00	14.68	7.14- 22.22	5.50	11
RC1-RP18	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP25	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP26	12	10 18	10	50.00	39.27	28.5- 50.0	7.75	31
RC1-RP27	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP28	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP35	7	8 16	1	100.00	44.44	44.4- 44.4	2.00	10
RC1-RP36	12	10 23	4	50.00	28.97	11.1- 42.86	6.50	13
RC1-RP37	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP38	13	10 23	2	0.00	-	-	-	-
RC1-RP45	-	-	-	-	-	-	-	-
RC1-RP46	9	10 16	6	50.00	35.65	22.2- 42.86	8.50	26
RC1-RP47	8	10 16	6	16.67	7.14	7.14- 7.14	4.00	4
RC1-RP48	-	-	-	-	-	-	-	-
Promedio	10	7 23	5	48.89	33.27	7.14- 80.0	5.97	21
Total	-	-	46	-	-	-	-	170

z

Días promedio desde el rescate de embriones hasta el transplante.

y

Mínimo y máximo de fertilidad del polen en las plantas RC1, en porcentaje.

El híbrido RC1 - RP26 fue en el que se rescató el mayor número de embriones (37%) (Cuadro 20) y el que produjo el mayor número de plantas transplantables (10). El máximo de plantas transplantables (10), de las cuales cinco florecieron. En los híbridos RP-15 y RP-16 el 67% de las plantas florecieron de un total de nueve y seis plántulas transplantadas. Por otro lado, del híbrido RC1-RP35 floreció la única planta transplantada (Cuadro 24).

Los híbridos RC1 provenientes de cruza con la F1 (descendientes de 89F-50-19), produjeron flores de color lila en una plantas y en otras de color blanco con tintes lila. Los demás híbridos produjeron flores de color blanco.

Se obtuvo una correlación lineal significativa ($P = 0.0063$) entre el número de embriones RC1 rescatados y el número de plantas RC1 transplantables (Cuadro 25).

Cuadro 25. Correlaciones entre el número de embriones RC1 rescatados y el número de plántulas RC1 transplantables.

Variables		Correlación (r)	Probabilidad
Número de embriones RC1 rescatados	vrs. Número de plantas RC1 transplantables	0.63	0.0063*

(r) Coeficiente de correlación de Pearson

* significativo al 0.01 nivel de probabilidad

H. Pruebas de viabilidad de polen de las RC1

En las RC1 se realizó la prueba de viabilidad del polen únicamente en una flor. Las otras se dejaron en las plantas madres para producir semilla por autopolinización.

El porcentaje de fertilidad del polen en las RC1 varió entre 7 y 80% (Cuadro 24). No se observaron diferencias significativas en la fertilidad del polen de las RC1 ($P = 0.075$) (Cuadro 26).

Cuadro 26 . Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas y autopolinización del material genético RC1.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	8	4975.67	621.96	3.94	0.075ns
Planta masculina (RC1)	8	4975.67	621.96	3.94	0.075ns
Error	18	2842.08	156.89		
Total	26	7817.75			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

I. Autopolinización de RC1

Las flores de las RC1 se dejaron en las plantas madres para la producción de semilla por autopolinización. Se produjo un total de 170 semillas RC1. La forma de las semillas RC1 producidas era similar a la del progenitor DOR 364 (P_v) utilizado como planta femenina.

No se observaron diferencias significativas ($P = 0.257$) en el número de semillas producidas por planta en las RC1 (Cuadro 27).

Cuadro 27. Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta después de la autopolinización del material genético RC1.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	7	178.16	25.45	3.86	0.257ns
Planta masculina (RC1)	7	178.16	25.45	3.86	0.257ns
Error	14	106.20	7.58		
Total	21	284.36			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

J. Retrocruzas congruentes del PIF

Las plántulas RC1 y RC2 que crecieron alcanzaron una longitud entre 35 y 75 cm.

Las semillas del genotipo 92-I1- RC2 no germinaron.

El tipo de crecimiento y la morfología de las hojas en las RC1 y en las RC2 fue similar al genotipo utilizado como progenitor femenino en la última retrocruza, ya fuese el *P. vulgaris* o el *P. acutifolius* (Fig. 14).



Fig. 14 Plantas de la segunda retrocruza RC2 en la etapa de floración. Planta del genotipo 92-I9-RC2 (izquierda) proveniente de la retrocruza 89F-50-18 x 92-I9-RC1 que muestra el tipo crecimiento y la morfología similar a su progenitor femenino (*Pa*). El genotipo 92-I7B-RC2 (derecha) proveniente de la retrocruza DOR 391 x 92-I7A-RC1 muestra características similares a *Pv*.

El color de las flores en las plantas RC1 y RC2 fue similar al color de las flores del genotipo utilizado como progenitor femenino. Las vainas fueron rectas con una ligera curvatura longitudinal. Sin embargo, transversalmente, los RC1 y RC2 descendientes del progenitor femenino *Pv*, produjeron vainas de forma ovoide y los descendientes de *Pa* aplanadas (Fig.15).

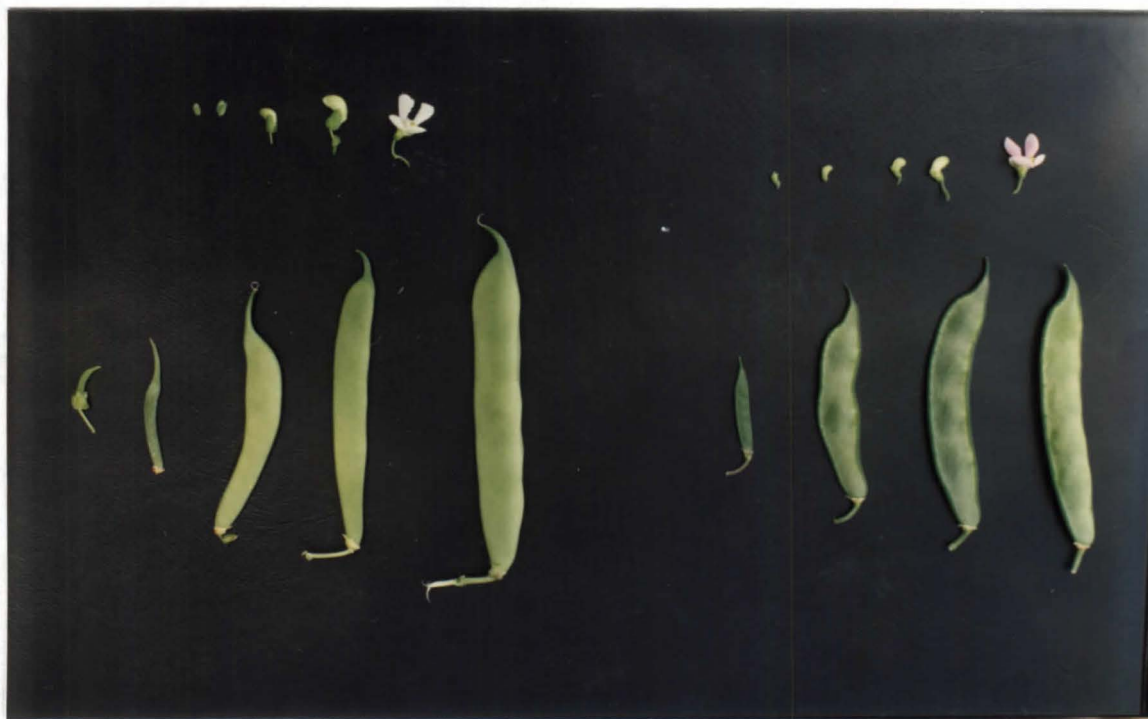


Fig. 15 Nótese a la izquierda las flores y las vainas del 92-I7A-RC2 descendiente de DOR 391 x 92-I7A-RC1. Las vainas son similares a las del progenitor de *Pv*. En el 92-I9-RC2 (a la derecha), descendiente de 89F-50-18 x 92-I9-RC1, las vainas son similares a las del progenitor de *Pa*.

Se realizaron 254 hibridaciones en las retrocruzas RC1 y 923 en las RC2. En general, en las retrocruzas RC1 y RC2, se hicieron un mayor número de cruas cuando se utilizó como planta femenina el *P. vulgaris*. En promedio, el mayor número de hibridaciones se hizo en la RC2 (132) comparado con la RC1 (92). El mínimo de hibridaciones (40) y el máximo (260) se hicieron en la RC2 (Cuadro 28 y 29).

K. Prueba de viabilidad del polen en el material genético del PIF

En las RC1 y RC2 se realizó la prueba de viabilidad del polen únicamente en una flor, las demás se utilizaron en las retrocruzas. Algunas plantas de las RC1 y las RC2 florecieron tardíamente en relación con las plantas femeninas, razón por lo que se las dejó en las plantas para que se autopolinizaran.

La quilla, las alas y los filamentos de los estambres en las flores de los genotipos RC1 y las RC2 eran frágiles y débiles. El polen de las anteras parecía contraído o vacío. El promedio de fertilidad del polen de las RC1 fue de 33%. Por otro lado, el de las RC2 fue de 37% (Cuadro 28 y 29). No se observaron diferencias significativas en la fertilidad de las RC1 y RC2 ($P = 0.1579$ y $P = 0.098$) (Cuadro 30 y 31).

Cuadro 28. Porcentajes de fertilidad del polen y semillas producidas en las retrocruzas congruentes (RC1) con materiales del PIF.

Avances de retrocruzas RC1 del PIF	Total de retrocruzas realizadas	Porcentaje de fertilidad RC1	Total de se- millas produ- cidas por planta (RC2)	Promedio de Semilla pro- ducidas por planta (RC2)	Semilla pro- ducida por autopolini- zación (F2)
DOR 364 x 92-I1-RC1	171	34.17	84.00	8.4	42
89F-50-19 x 92-I4-RC1	83	32.42	57.00	5.7	0
Promedio	92	33.3	70.00	7.05	-
Total	254	-	141.00	-	42

Cuadro 29. Porcentajes de fertilidad del polen y semillas producidas en las retrocruzas congruentes (RC2) con materiales del PIF.

Avances de retrocruzas RC2 del PIF	Total de retrocruzas realizadas	Porcentaje de fertilidad RC2	Total de se- millas produ- cidas por planta (RC3)	Promedio de Semilla pro- ducidas por planta (RC3)	Semilla pro- ducida por autopolini- zación (F2)
DOR 364 x 92-I4-RC2	147	31.17	156	15.6	67
DOR 364 x 92-I5-RC2	260	39.66	166	16.6	103
89F-50-18 x 92-I7A-RC2	72	49.78	37	7.4	26
89F-50-19 x 92-I7B-RC2	167	33.56	79	7.9	27
DOR 482 x 92-I9-RC2	40	32.83	27	13.5	28
Promedio	132	36.6	100	12.45	74
Total	923	-	602	-	442

Cuadro 30. Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas RC1 del PIF.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	1	15.26	15.26	2.17	0.1579ns
Planta masculina	1	15.26	15.26	2.17	0.1579ns
Error	18	126.49	7.03		
Total	19	141.75			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

Cuadro 31. Análisis de la variancia de la fertilidad del polen en las retrocruzas RC2 del PIF.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	5	284.76	56.95	2.13	0.0816ns
Planta femenina	3	6.52	2.17	0.08	0.9699ns
Planta masculina	2	278.24	139.12	5.19	0.0987ns
Error	41	1098.44	26.79		
Total	46	1383.20			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

L. Producción de semilla

Se produjeron 141 semillas RC2 y 602 semillas RC3 a partir de las retrocruzas congruentes. Estas semillas fueron similares a las observadas en los genotipos utilizados como progenitores femeninos. El promedio de semillas por planta RC3 fue mayor (12.45) que el obtenido para las RC2 (7.05). Se produjo semilla por autopolinización tanto en las generaciones RC1 como en las RC2. El total de semillas obtenidas fue de 42 y 442, respectivamente (Cuadro 28 y 29).

No se observaron diferencias significativas ($P = 0.6166$) en el número de semillas RC2 obtenidas por planta (Cuadro 32). Sin embargo, se obtuvo diferencias significativas ($P = 0.0022$) en el número de semillas RC3 obtenidas por planta (Cuadro 33).

Cuadro 32. Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC1 del PIF.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	1	7.23	7.23	0.26	0.6166ns
Planta femenina	1	7.23	7.23	0.26	0.6166ns
Error	16	443.27	27.70		
Total	17	450.50			

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

Cuadro 33. Análisis de la variancia del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC2 del PIF.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Probabilidad
Tratamiento	5	756.33	151.26	4.05	0.0045*
Planta femenina	3	648.91	216.30	5.79	0.0022*
Planta masculina	2	107.41	53.71	1.44	0.2493ns
Error	40	1493.32	37.33		
Total	46	2249.65			

* significativo al 0.05 nivel de probabilidad

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

En el Cuadro 34 se observa que la retrocruza entre DOR 364 y 92-I5-RC3 produjo el mayor número de semillas RC3 por planta (18.44), y presentó diferencias significativas en relación con las cruzas 89F-50-19 x 92-I7B-RC2 y 89F-50-18 x 92-I7A-RC3 que tuvieron una media de 7.90 y 7.40, respectivamente.

Cuadro 34. Separación de medias del número de semillas producidas por planta en las retrocruzas RC2 del PIF.

Material genético RC3 producido	Media	Letra
DOR 364 x 92-15-RC2	18.44	A
DOR 364 x 92-I4-RC2	15.60	A
DOR 364 x 92-I3-RC2	13.70	A
DOR 482 x 92-I9-RC2	13.50	A
89F-50-19 x 92-I7B-RC2	7.90	B
89F-50-18 x 92-I7A-RC2	7.40	B

No hubo una correlación significativa entre el prendimiento y la viabilidad del polen y el número de semillas por vaina, tampoco hubo correlación entre la viabilidad del polen y el número de semillas por vaina (Cuadro 35)

Cuadro 35. Correlación entre el prendimiento, la viabilidad del polen y el número de semillas por vaina en la fase de retrocruzas.

Variable	Correlación (r)	Probabilidad
Prendimiento vrs. viabilidad del polen	0.11	0.4621ns
Prendimiento vrs. número de semillas por vaina	0.14	0.4431ns
Viabilidad del polen vrs. número de semillas por vaina	0.20	0.3212ns

r = Coeficiente de correlación de Pearson

ns no significativo al 0.05 nivel de probabilidad

V. DISCUSION

A. Hibridación interespecífica entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*

La hibridación constituye el principal medio para el mejoramiento interespecífico entre el frijol común y el frijol tepari. A través de la hibridación se han logrado formas cultivadas superiores a las existentes. Buena parte del éxito de un programa de mejoramiento del frijol depende del alto rendimiento que se obtenga de la hibridación (CIAT, 1982).

De acuerdo con los resultados que se presentan en los Cuadros 6, 7 y 8, el rendimiento de las cruzas interespecíficas varió según el genotipo de *P. acutifolius* involucrado. Andrade- Aguilar y Jackson (1988) y Ortega (1992), informaron que el rendimiento no es necesariamente mayor con aquellos genotipos parentales con los que se realiza el mayor número de cruzas, sino que, depende, en gran parte, del grado de compatibilidad entre ellos. En este estudio, la línea 89F-50-19, en combinación con cualquiera de los cuatro genotipos de *Pv* produjo los mayores promedios de vainas desarrolladas (Cuadro 8). Probablemente, la línea 89F-50-19 fue más compatible que las otras cuando se cruzaron con los genotipos de *Pv*. Nelson y Ascher (1985), observaron diferencias entre las líneas de *P. acutifolius* utilizadas como planta masculina cuando se cruzaron con genotipos de *P. vulgaris*. Indicaron que estas diferencias probablemente se debieron a la habilidad combinatoria general (HCG) que presentaron las líneas del *Pa*.

El CIAT (1979, 1982) menciona que un factor que influye en la eficiencia de la hibridación es la adaptación, especialmente en la etapa reproductiva. En esta investigación, la adaptación fue, probablemente, un factor que influyó en el prendimiento. La línea 89F-50-19 de *Pa* tuvo buen crecimiento vegetativo y reproductivo (floración abundante) durante los meses de noviembre, diciembre y enero, periodo en el que se realizaron las hibridaciones. La línea criolla F-0078 fue la menos adaptada, posiblemente debido a las condiciones ambientales (altitud de 800 msnm y la temperatura de 18 a 27°C) de los invernaderos en los meses en los que se realizó la hibridación y que son diferentes a las de la zona sur de Honduras de donde fue recolectada (200 msnm y la temperatura de 25 a 35°C).

Buishand (1956), CIAT (1979,1982), Thomas y Waines (1984), Haghighi (1987) y Andrade-Aguilar y Jackson (1988), afirmaron que el prendimiento en las cruzas interespecíficas entre *Pv* y *Pa* depende grandemente de la técnica utilizada para la hibridación. El método de polinización empleado en este estudio fue el de "hibridación con el estigma desnudo", descrito por el CIAT (1982) para hibridaciones entre genotipos de *Phaseolus vulgaris*. El prendimiento promedio obtenido en esta investigación fue del 13%, insuficiente para producir una buena cantidad de vainas desarrolladas si se toma en cuenta el alto número de cruzas realizadas (3.228) (Cuadro 6).

El programa de mejoramiento del frijol del CIAT (1979) y Muñoz e Hidalgo (1986) utilizaron la técnica de la "emasculación con el estigma cubierto" o "hooking" para hibridizar el *Pv* x *Pa*, con el que obtuvieron un 50% y 34% de prendimiento, respectivamente. Esta técnica consiste en emascular el botón floral madre y luego polinizar con el estigma de la flor padre frotando y dejándolo sobre el estigma de la flor polinizada. No se extraen las alas del botón floral madre y así se mantiene una humedad relativa adecuada y se protege al estigma.

Andrade-Aguilar y Jackson (1988) obtuvieron un 68% de prendimiento en cruzas interespecíficas entre *Pv* y *Pa*. Utilizaron la técnica de cruzamiento conocida como "método de inserción", que consiste en poner el estilo, el estigma y los estambres del progenitor masculino encima del estilo y el estigma del progenitor femenino después de la emasculación, para reducir la disecación de los órganos reproductivos y asegurar una buena fertilización. Al igual que en el método anteriormente mencionado, no se quitan las alas de la flor madre.

De acuerdo con los análisis de variancia, la variación del error fue mayor en relación con los efectos de los tratamientos. Esto, probablemente, se deba a que hubo ciertos factores que pudieron afectar la hibridación como las condiciones ambientales y el estado fisiológico y fenológico de las plantas. Entre las condiciones ambientales están la habilidad de las personas para realizar las hibridaciones, la variación de la hora y, consecuentemente, la temperatura. Finalmente, las hibridaciones al azar, es decir, que una flor recién abierta del genotipo usado como planta masculina se cruzaba con un botón floral adecuado de cualquier genotipo utilizado como planta femenina. El estado morfológico y fisiológico de las plantas están muy relacionados el uno con el otro, como menciona el CIAT (1982). Hacia el final del periodo de floración ocurre en mayor grado la abscisión de las flores. Este fenómeno se observó en la fase de hibridación inicial, en la que se trató de producir el mayor número de cruzas posibles para obtener un número adecuado de vainas desarrolladas y de embriones rescatados, por lo que en algunos genotipos parentales se utilizaron flores a mediados y al final de la etapa R6.

En esta investigación se utilizaron como genotipos parentales de *Pv* al DOR 364, DOR 391, DOR 482 y DANLI 46 y en los genotipos de *Pa* al 89F-50-18, 89F-50-19, A-80-10 y F-0078, con los que se obtuvo un prendimiento entre 6 y 28%. Estos resultados, probablemente, se pueden atribuir a la mayor compatibilidad de algunos genotipos. Muñoz e Hidalgo (1986) obtuvieron un 34% de prendimiento y Andrade-Aguilar y Jackson (1988) obtuvieron un 68%. Utilizaron distintos genotipos parentales, tanto de *Pv* como de *Pa*. Los investigadores mencionados concluyeron que el prendimiento en cruza interespecíficas entre *Pv* y *Pa* está influido por los genotipos parentales utilizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la longitud y el diámetro de las vainas, los días desde la hibridación hasta el rescate y el color verde de las vainas al momento de su remoción de la planta madre fueron similares a los observados por otros investigadores (Mok, Mok y Rabakoarihanta, 1978, Andrade-Aguilar y Jackson, 1988); aunque Ortega (1992) indica que removió las vainas de la planta madre cuando tenían un color amarillo. En este experimento, sin embargo, las vainas de color amarillo se arrugaron y los óvulos en su interior se atrofiaron y no desarrollaron.

Las vainas cortas y angostas (Cuadro 6) provenientes de cruces interespecíficos se debieron, probablemente, a fallas entre el endosperma y el embrión. Estos resultados coinciden con los de Rabakoarihanta, Mok y Mok (1979), quienes observaron estas características e indicaron que los inconvenientes entre el endosperma y el embrión se deben a la combinación genética entre estas dos especies (*Pv* y *Pa*), y a la dirección de las cruza.

Observaron que, cuando el *Pv* es utilizado como planta femenina se presenta menor formación del endosperma, comparado con semillas autofecundadas normales, y cuando se utiliza el *Pa* como madre se presentan retrasos en la división celular del embrión.

B. Rescate de embriones

En este estudio el rango en los días desde la hibridación hasta el rescate de embriones fue de 8 a 24, que coincidió con los trabajos de Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978); Rabakoarihanta, Mok y Mok (1979); Andrade- Aguilar y Jackson (1988) y Waines, Manshardt y Wells (1988), quienes rescataron los embriones provenientes de cruza interespecíficas entre *Pv* y *Pa* entre los 3 y 24 días.

En este estudio se encontró que se pueden rescatar embriones de hasta 0.5 mm, sin embargo, su manipulación al realizar la disección es muy difícil, por lo que se rescataron únicamente los que medían 1 mm o más. Al respecto, Thomas y Waines (1984) encontraron que es conveniente cultivar embriones con longitud mayor a 1 mm, pero observaron que los de longitud superior a 2 mm produjeron los mayores promedios de embriones desarrollados.

En este estudio se observó que la manipulación durante el cultivo *in vitro* fue más fácil en los embriones de mayor tamaño y que se encontraban en el centro de la vaina. En investigaciones realizadas por Sabja, Mok y Mok (1990), encontraron que no existen diferencias significativas en la posición y el tamaño de los embriones híbridos en las vainas, pero que los embriones de mayor tamaño son los más fáciles de rescatar independientemente del lugar donde se encuentren. Concluyeron que, probablemente, no hubo competencia por nutrimentos entre los embriones dentro de la vaina, ya que observaron que los embriones después de formarse no continuaron con su desarrollo.

De acuerdo con las observaciones respecto a la facilidad con que se pueden rescatar los embriones híbridos de mayor tamaño, Al-Yasiri y Coyne (1964); CIAT (1979) observaron que se pueden obtener embriones de mayor tamaño retrasando el tiempo de abscisión de las vainas y consecuentemente del aborto de los embriones a través del uso de reguladores de crecimiento (CPA, P4 cloro fenoxiacético).

De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 12, el poco crecimiento de las raíces, los tallos y el desarrollo de las hojas de las plántulas híbridas coinciden con las observaciones hechas por Sabja, Mok y Mok (1990), quienes indicaron que el crecimiento tan limitado de los embriones y su desarrollo posterior es debido a efectos intrínsecos y que las bases fisiológicas aún no se conocen. Indicaron también que posiblemente exista un desbalance en la biosíntesis y metabolismo hormonal de los embriones.

Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978), indicaron que el crecimiento de los embriones es afectado grandemente por los genotipos parentales, ya que encontraron diferencias en el crecimiento de los embriones únicamente cuando el *Pa* se utilizó como planta masculina y no así en el proveniente del cruce recíproco. Esta investigación no se orientó al estudio de las causas del crecimiento de los embriones híbridos, mas, basándonos en las vainas angostas y cortas, la longitud de las raíces y el desarrollo de las hojas simples y trifolioladas (Cuadros 6 y 13) y en las investigaciones anteriormente mencionadas, se puede decir que posiblemente el mayor desarrollo de los embriones desde la cruce hasta el momento del rescate y durante su cultivo estuvo influido por algún efecto intrínseco del *Pv*. Thomas y Waines (1984); Waines, Manshardt y Wells (1988), indicaron, también, que el genotipo de *P. vulgaris* utilizado como planta femenina es el factor más importante en la obtención de embriones híbridos.

En este estudio, la forma ovoide de los cotiledones, la radícula agrandada en relación con los cotiledones y la diferencia en el tamaño de los cotiledones en un mismo embrión, fue similar a las descritas por Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978), Haghighi (1987), Andrade-Aguilar y Jackson (1988), y Sabja, Mok y Mok (1990), quienes observaron también este crecimiento anormal de los embriones. Indicaron que probablemente ese crecimiento fue causado por la recombinación genética entre ambos

genotipos, ya que no se observaron esas características en los embriones de *Pv* a esa misma edad.

La variación en la supervivencia y la falta de crecimiento de los embriones híbridos (Cuadro 12), probablemente se deba a las características genéticas propias de cada híbrido F1, ya que el medio de cultivo y las condiciones bajo las cuales crecieron en esta etapa fueron iguales para todos. Waines, Manshardt y Wells (1988), indicaron que en la fase del cultivo *in vitro*, la diferencia en la supervivencia entre los embriones F1 se debe probablemente a causas genéticas, consecuentemente heredados por los embriones F1.

Andrade- Aguilar y Jackson (1988), indicaron que probablemente la ausencia de los cotiledones en el embrión y de las hojas primarias sean características útiles para verificar embriones provenientes de cruces interespecíficos entre *Pv* y *Pa*, ya que únicamente observaron esta características en algunos híbridos. En nuestro estudio, la ausencia de los cotiledones en el embrión y la falta del desarrollo de las hojas primarias durante el cultivo *in vitro* fueron observadas, sin embargo, no se los identificó específicamente y consecuentemente ya no se los volvió a observar en la fase de adaptación.

C. Transplante y adaptación de los híbridos F1

La correlación obtenida entre los embriones rescatados y las plántulas transplantables ayuda a explicar lo que sucedió en la fase del rescate de embriones, donde el crecimiento de los embriones varió según el tratamiento. Se puede presumir que, probablemente, las diferencias en la supervivencia de los embriones en el cultivo *in vitro* se deben a efectos estrictamente genéticos. Por el contrario, no se puede atribuir

específicamente este mismo hecho a la mayoría de las F1, ya que algunas plantas híbridas sobrevivieron y llegaron a florecer y otras murieron en los primeros días de adaptación. Esto, posiblemente, se debió también al severo estrés al que fueron sometidas cuando se transplantaron y cambiaron del tubo de ensayo a la maceta cubierta con plástico. En una prueba adicional que realizamos con plantas provenientes de autopolinizaciones de *Pv* y cultivadas *in vitro*, pudimos observar que florecieron 13 de 15 plántulas transplantadas. A pesar de que fue una cantidad muy pequeña de plantas y donde los datos fueron insuficientes, podría ayudar a explicar que posiblemente las causas de la supervivencia de los híbridos F1 transplantados se debieron a características genéticas propias de los híbridos, ya que solamente la mitad de las plantas florecieron. Mok, Mok y Rabakoarihanta (1978), Haghighi (1987), Waines, Manshardt y Wells (1988), informaron que la muerte de las plántulas F1 durante el periodo de adaptación hasta la floración está afectado, posiblemente, por el trasplante y las características genéticas de los híbridos.

Algunas plántulas produjeron ramas laterales a partir de yemas del nudo cotiledonar como respuesta de las yemas laterales a crecer después de la muerte de la yema apical y de la consecuente pérdida de dominancia apical.

El hábito de crecimiento indeterminado arbustivo e indeterminado observado en las F1 fue similar al del progenitor femenino. Esto, probablemente se deba a la presencia de genes dominantes. De igual manera, Andrade- Aguilar y Jackson (1988) observaron que el tipo de crecimiento en las F1 fue similar al de los progenitores utilizados como planta femenina. Sin embargo, la morfología de la hoja y de la flor fue parecida a la observada en el progenitor masculino, probablemente, debido a la dominancia de los genes en las plantas masculinas sobre el de las plantas femeninas. Andrade- Aguilar y Jackson (1988) observaron estas mismas características. Indicaron que probablemente estas características se deban a la presencia de genes dominantes.

El crecimiento anormal de los folíolos, la aparición de puntos y manchas de color blanco y amarillo sobre la superficie de las hojas en las plantas híbridas coinciden con las observaciones hechas por varios investigadores como Smartt (1970); Pratt, Manshardt y Wells (1985) y Haghighi (1987), quienes también observaron estas características. Indicaron que, posiblemente, se deban a trastornos cloróticos producto de la incompatibilidad entre los progenitores.

D. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos F1

La baja fertilidad obtenida en las F1 (2 a 28%), coincide con los datos obtenidos por otros investigadores (Smartt, 1970; Thomas y Waines, 1984, Pratt, Bressan y Hasegawa, 1985; Haghighi, 1987; Haghighi y Ascher, 1988 y Ortega 1992), quienes informaron que la fertilidad del polen en los híbridos provenientes de *Pv* x *Pa* fue entre 0 y 38%.

La esterilidad es el resultado de la imposibilidad de los cromosomas de los híbridos para aparearse (falta de homología) en la meiosis. Al respecto, Hwang (1978) y Rabakoarihanta *et al.* (1980) (citados Hucl y Scoles, 1985), estudiaron la meiosis y fertilidad en híbridos interespecíficos entre *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus acutifolius* y observaron que hay una separación y pérdida temprana de apareos bivalentes durante la metafase I. Consecuentemente, ocurre una unión defectuosa y una mala orientación de los cromosomas.

La mayor variación del error en relación con la variación de la fertilidad del polen en los híbridos F1 probablemente se debió a que hubo ciertos factores que pudieron afectar la prueba de fertilidad del polen, entre los que se encontraban flores removidas de diferentes partes de la planta, diferencia en el tiempo transcurrido desde la remoción de

la flor hasta el inicio de la prueba, polen observado en distintos campos visuales, y otros más. La variancia en la fertilidad del polen entre los híbridos F1 utilizados como plantas masculinas se debió, posiblemente, a diferencias genéticas entre cada uno de ellos.

E. Retrocruzas congruentes

Rabakoarihanta *et al.* (1980) (citados por Hucl y Scoles, 1985), Thomas y Waines (1984) informaron que cuando utilizaron el *Pv* o *Pa* como planta masculina en la fase de retrocruzas, hubo muchos embriones abortados en las RC1. Por esta razón, en este experimento utilizamos la F1 para polinizar a los genotipos parentales de *Pv*. Se utilizó el *Pv* como planta femenina en la primera retrocruza congruente ya que sus flores son de mayor tamaño y fáciles de manipular en la hibridación. Haghighi (1987), informó que la hibridación se realiza con mayor facilidad en la primera retrocruza cuando se utiliza el *Pv* como planta femenina ya que el *Pa* tiene flores muy delicadas.

El método de la retrocruza congruente no se pudo comparar con el método tradicional de mejoramiento (retrocruza recurrente) que se ha usado en la obtención de híbridos interespecíficos entre *Pv* y *Pa*. En este estudio se realizó únicamente la primera retrocruza hacia el genotipo parental *Pv*, lo que en la práctica es una retrocruza recurrente.

Haghighi (1987) y Haghighi y Ascher (1988), mencionan que el uso de la retrocruza congruente podría ser una solución en la obtención de híbridos interespecíficos entre *Pv* y *Pa* en generaciones avanzadas. Concluyeron que probablemente se deba a que se aumenta la probabilidad de recombinación genética, ya que se mantienen las características deseables de ambos genotipos parentales cuando se cruza el híbrido en forma alternada con *Pv* y *Pa* (se presume que contienen un 100 % de gametos viables).

Al igual que en la hibridación inicial, el éxito del prendimiento en las retrocruzas (Cuadro 17) está influido por las combinaciones entre los genotipos de *Pv* y por el grado de compatibilidad que exista con los híbridos F1. La variación del error en esta fase probablemente de debió a la habilidad de las personas para realizar las hibridaciones, la variación de la hora, la temperatura, hibridaciones al azar, entre otras.

F. Rescate de embriones provenientes de la primera retrocruza (RC1)

En esta fase se cosecharon todas las vainas desarrolladas de las retrocruzas y posteriormente se realizó el rescate de embriones. Se rescataron los embriones provenientes de la primera retrocruza para aumentar la probabilidad de obtener plántulas RC1 y posteriormente de semilla híbrida. En trabajos realizados por varios investigadores (Rabakoaranta, Mok y Mok, 1979 y Ortega, 1992) no utilizaron el cultivo *in vitro* en la primera retrocruza lo que les produjo aborto de los embriones en la mayoría de las vainas y obtuvieron muy poca o ninguna semilla. Concluyeron que, posiblemente, el aborto se debe a incompatibilidad entre el endosperma y el embrión. Sin embargo, Thomas y Waines (1984), afirmaron que es necesario el cultivo *in vitro* para obtener descendencia de la primera retrocruza (genotipo parental x F1). Observaron que después de realizar las hibridaciones y dejar las vainas en la planta madre, todas las vainas cayeron y no obtuvieron semilla híbrida, mientras que cuando realizaron el rescate de embriones *in vitro* obtuvieron descendencia.

En este estudio, la forma ovoide de los cotiledones, el color blanco de los embriones, la radícula agrandada en relación con los cotiledones y éstos de diferente tamaño en un mismo embrión fue similar a la observada en el rescate de los embriones F1. Con base en estos resultados, estas características de anomalía de los embriones

RC1 posiblemente se deban, también, a efectos intrínsecos de los embriones RC1 causada por la recombinación genética entre los padres y la F1. En este estudio observamos que la mayoría de los embriones RC1 eran de menor tamaño que los embriones F1. De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 20, las observaciones coinciden con las de Waines, Manshardt y Wells (1988). Estos autores informaron que la manipulación en el rescate de los embriones RC1 *in vitro* es mucho más difícil comparada con los embriones F1. Lo anterior puede estar relacionado con el menor tamaño de los embriones RC1, que hace más complicada su extracción.

G. Adaptación de las RC1

Algunos híbridos RC1 tuvieron crecimiento indeterminado arbustivo y en otros el crecimiento indeterminado. Se observó la morfología típica de las hojas del *Pv* en algunos híbridos y en otros la del *Pa*, flores de color blanco en unas plantas, en otras de color lila y también de color blanco con tintes lila, debido a la segregación de las plantas híbridas RC1. Al respecto, Haghighi (1987) mencionó que observó segregación en los híbridos a partir de la primera retrocruza en la morfología de las hojas, en las flores y en el tipo de crecimiento de la planta.

La supervivencia de los híbridos RC1, probablemente se debió a características genéticas propias de cada una de ellas, ya que solamente la mitad de plantas florecieron. El resto murieron en los primeros días después del transplante, probablemente afectados por el estrés al que fueron sometidas con el cambio de ambiente.

H. Prueba de viabilidad de polen de los híbridos RC1

La fertilidad del polen en las plantas RC1 (7- 80%) coincide con la que observaron en varios trabajos (Pratt, Bressan y Hasegawa, 1985; Haghighi, 1987; Waines, Manshardt y Wells, 1988 y Haghighi y Ascher, 1988) donde la fertilidad del polen en la RC1 ($P_v \times F_1$) varió entre 0 y 71%, superior a la de las F1. En este estudio se observó que la fertilidad del polen en las plantas RC1 (7-80%) fue también superior a la que observamos en las F1 (2-28%).

El aumento en la fertilidad de las RC1 comparado con las F1, probablemente se debió a que se pudo haber incrementado en mayor grado las características deseables (fertilidad) del *P. vulgaris* cuando se retrocruzó con la F1.

Pratt, Bressan y Hasegawa (1985), Haghighi (1987) y Haghighi y Ascher (1988), indican que se puede aumentar la fertilidad de los híbridos en la primera retrocruza. Además, cuando se continúan las retrocruzas recurrentes, se aumenta la fertilidad del polen en forma gradual en cada generación, y puede llegar a ser tan fértil como el padre recurrente. Por otro lado, en las retrocruzas congruentes a partir de las RC1 la fertilidad decrece hasta la cuarta o quinta retrocruzas, pero después se incrementa paulatinamente hasta llegar a porcentajes adecuados de fertilidad, aunque no tan altos como los de los progenitores, posiblemente por las hibridaciones constantes hacia ambos padres.

I. Autopolinización de RC1

De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 24, se produjo una buena cantidad de semilla (170) RC1 por autopolinización. Probablemente, el uso de la técnica del rescate de embriones haya contribuido en gran manera a la alta producción de semilla híbrida F1 y especialmente para obtener los híbridos RC1. Ortega (1992) utilizó 192 plantas de P_v como plantas femeninas y 96 de P_a como masculinas para realizar las

cruzas iniciales, obtuvo híbridos F1 utilizando el rescate de embriones. Obtuvo 13 semillas RC1 autopolinizadas, mas no hizo rescate de embriones.

J. Retrocruzas congruentes del PIF

En esta investigación, probablemente el mayor número de retrocruzas realizadas con el progenitor *Pv* se deba a que sus flores son de mayor tamaño y menos delicadas que las flores del *Pa*. Haghighi (1987) y Haghighi y Ascher (1988) observaron que, en general, realizaron mayor número de hibridaciones cuando utilizaron el *Pv* como planta femenina que cuando utilizaron el *Pa*, y que, probablemente, se debió a que las flores del *Pa* son más pequeñas que las del *Pv*.

Las características del tipo de crecimiento, la morfología de las hojas en las RC1 y en las RC2 fueron similares al genotipo utilizado como progenitor femenino en la última retrocruza congruente. Probablemente, esto, se deba al aumento en los genes responsables por estas características maternas. En contraste con lo anterior, Haghighi y Ascher (1988) observaron nuevas características en la descendencia después de realizar la segunda y tercera retrocruzas congruentes. Entre estas características observaron deformación en las hojas, escasa altura de las plantas, la presencia de nuevas bandas en los patrones de peroxidasa de los tejidos de la raíz después de realizar la prueba de electroforesis, y otras más. Indicaron que probablemente se deba a nuevas recombinaciones de genes del genotipo parental y el híbrido, en los cuales se realizó la última retrocruza. Waines, Manshardt y Wells (1988) utilizaron únicamente el *P. vulgaris* como planta femenina para las retrocruzas y observaron que la mayoría de las poblaciones descendientes segregaron hacia el *P. vulgaris* después de realizar la primera y segunda retrocruzas.

K. Prueba de viabilidad del polen del material genético del PIF

Ortega (1992) observó una fertilidad entre 7 y 17% en los híbridos F1 que dieron origen al material RC1 y RC2 utilizado en esta etapa del trabajo. En nuestro estudio observamos un aumento de la fertilidad de 33% en la RC1 a 37% en la RC2 después de que se realizaron las retrocruzas congruentes. En contraste con lo anterior, Haghighi (1987) y Haghighi y Ascher (1988), mencionan que la fertilidad disminuye cuando se realiza la segunda retrocruza congruente a partir de material genético de la primera, pero que en la cuarta o quinta generaciones se incrementa la fertilidad. De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 29, la fertilidad aumentó en la RC2, y probablemente se deba a que este material fue producido por autopolinización antes de realizar la retrocruza congruente. Esto pudo haber influido en el incremento de la fertilidad del polen ya que se fijan ciertas características y se aumenta la homocigocidad. Thomas y Waines (1984) indican que una forma de incrementar la fertilidad del material genético es a través de las retrocruzas y también mediante la autopolinización.

L. Producción de semilla

De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 34, se observa que al utilizar el *P. vulgaris* como planta femenina en la segunda retrocruza congruente se produjo un mayor número de semillas por planta que cuando se utilizó el *P. acutifolius* como madre. Esto, probablemente se deba a que en el *Pv* es más fácil realizar las hibridaciones ya que tiene flores de mayor tamaño comparadas con las del *Pa*. Por esta razón, se utilizó también en la cruce inicial como planta femenina. Al- Yasiri y Coyne (1966) y Andrade-Aguilar y Jackson (1988) indican que el *Pv* presenta mejores características para la obtención de embriones híbridos comparado con el *Pa*.

VI. CONCLUSIONES

1. En la obtención de híbridos interespecíficos entre *Pv* y *Pa* existen genotipos más compatibles que otros.
2. La técnica del rescate de embriones es necesaria para la obtención de híbridos F1 entre *P. vulgaris* y *P. acutifolius*.
3. La utilización del *P. vulgaris* como planta femenina en la primera retrocruza congruente aumenta la fertilidad en los híbridos RC1 obtenidos.
4. El cultivo *in vitro* es necesario para la obtención de híbridos RC1.
5. La baja fertilidad del polen en la descendencia proveniente de cruza interespecíficas entre *Pv* y *Pa* se debe a la baja compatibilidad entre estas especies.
6. El método de rescate y adaptación de los híbridos F1 y RC1 es eficiente.
7. El prendimiento en las retrocruzas congruentes es superior cuando se utiliza el *P. vulgaris* como planta femenina.
8. El método de retrocruzas congruentes aumenta la fertilidad del polen en la primera, segunda y tercera generaciones.
9. El *P. vulgaris* es más compatible que el *P. acutifolius* para la obtención de semilla híbrida en la segunda y tercera retrocruzas congruentes.

VII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar los genotipos de *Pv* DOR 391, DOR 364, DOR 482 Y DANLI 46 y la línea de *Pa* 89F-50-19 para producir las F_1 iniciales entre *Pv* y *Pa*.
2. Realizar estudios de las diferentes técnicas de hibridación utilizadas en cruas interespecíficas entre *Pv* y *Pa*.
3. Utilizar la técnica del rescate de embriones para la obtención de híbridos interespecíficos F_1 y RC_1 .
4. Realizar estudios de electroforesis para comprobar los híbridos F_1 , RC_1 , RC_2 y RC_3 .
5. Evaluar y estudiar la fertilidad del polen en las generaciones RC_2 y RC_3 .

VIII. LITERATURA CITADA

- AL-YASIRI, S.; COYNE, D. P. 1964. Effect of growth regulators in delaying pod abscission and embryo abortion in the interspecific cross *Phaseolus vulgaris* x *P. acutifolius*. Crop Science (EE.UU.) 4: 433-435.
- ; -----, 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. Crop Science (EE.UU.) 6: 59-60.
- ANDRADE-AGUILAR, J.A.; JACKSON, M.T. 1988. Attempts at interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray using embryo rescue. Plant Breeding. (EE.UU.) 101: 173-180.
- BRÜCHER, O. B.; BRÜCHER, H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Economic Botany (EE.UU.) 30: 257-272.
- BUISHAND, T.J. 1956. The crossing of beans (*Phaseolus* spp). Euphytica (Holanda) 5 : 41-50.
- CIAT. 1979. Cruzamiento del frijol. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p.36.
- CIAT. 1980. Diversidad genética de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 52p.
- CIAT. 1982. Cruzamiento del frijol. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 34p.
- COYNE, D. P. 1964. Species hybridization in *Phaseolus*. Journal of Heredity (EE.UU.) 55: 5-6.

- EVANS, A. M. 1973. Genetic improvement of *Phaseolus vulgaris*. In nutritional improvement of food legumes by breeding. P.G.A. Symposium. F.A.O. Roma (1972), Italia. p. 107-115.
- , 1980. Structure, variation, evolution, and classification in *Phaseolus*. In advances in legume science. Ed. by R. J. Summerfield and H. Bunting. England, University of Cambridge. p.337-447.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean. In Common beans. Research for crop improvement. Ed. by A. van Schoonhoven and O. Voysest. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p.7-53.
- HAGHIGHI, K. 1987. Methods of hybridization of two beans species: *Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius*. Ph.D. Thesis. University of Minnesota, Minnesota, EE. UU. 106p.
- , ASCHER, P. D. 1988. Fertile, intermediate hybrids between *Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius* from congruity backcrossing. Sexual Plant Reproduction (EE. UU.) 1: 51-58.
- HONMA, S. 1956. A bean interespecific hybrid. Journal of Heredity (EE.UU.) 47:217:220.
- HUCL, P.; SCOLES, G. J. 1985. Interespecific hibridization in the common bean: A review. Hort Science (EE.UU.) 20 (3): 352:357.
- JENSEN, W.A. 1962. Histological Procedures. In Botanical Histochemistry. Principles and practices. San Francisco (EE.UU.), Freeman. p. 55-99.
- KAPLAN, L. 1981. What is the origin of the common bean?. Economic Botany (EE.UU.) 35 (2): 240-254.

- MOK, D. W. S.; MOK, M. C.; RABAKOARIHANTA, A. 1978. Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.) 52: 209:215.
- MUÑOZ, L.C.; HIDALGO, R. 1986. Problemas en la hibridación interespecífica del género *Phaseolus*: aborto del embrión. Ensayo preliminar de cultivo de embriones. Acta Agronómica. Palmira, Colombia. 36 (4): 17-27.
- NABHAN, G. P.; FELGER, R. S. 1978. Teparies in south-western North America: A biogeographical and ethnohistorical study of *Phaseolus acutifolius*. Economic Botany. 32: 3-19.
- NELSON, B.M.; ASCHER, P.D. 1985. Influence of parental lines on making *Phaseolus vulgaris* - *P. acutifolius* hybrids. Miscellaneous journal series article number 1920 of the Minnesota Agricultural Experiment Station, University of Minnesota, St. Paul. (EE.UU) p. 40-41.
- ORTEGA, E. E. 1992. Obtención de híbridos interespecíficos entre frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol tepari (*P. acutifolius* A. Gray) mediante el rescate y cultivo de embriones. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 61p.
- PRATT, R. C.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, M.P. 1985. Genotypic diversity enhances recovery of hybrids and fertile backcrosses of *Phaseolus vulgaris* L. x *P. acutifolius* A. Gray. Euphytica (Holanda) 34: 329- 344.
- RABAKOARIHANTA, A.; MOK, D. W. S.; MOK, D. C. 1979. Fertilization and early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.) 54: 55-59.
- ROSAS, J.C. 1994. Manual del cultivo del frijol. Departamento de Agronomía. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 66p.

- SABJA, A. M.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. 1990. Seed and embryo growth in pod cultures of *Phaseolus vulgaris* and *P. vulgaris* x *P. acutifolius*. Hort Science (EE.UU.) 25 (10):1288:1291.
- SAS. 1990a. SAS^R Language guide for personal computers, Version 6.04 Edition. Cary, North Carolina (EE.UU). SAS Institute Inc. 429p.
- SAS. 1990b. SAS/ STATTM guide for personal computers, Version 6.04 Edition. Cary, North Carolina (EE.UU). SAS Institute Inc. 378p.
- SCOTT, H. G. 1968. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. Economic Botany (EE.UU.) 35 (2):55-68.
- SERRACIN, J.; YOUNG, R. A.; ROSAS, J. C.; CACERES, J. 1991. Daños causados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y su efecto en el rendimiento de frijol común (habichuela: *Phaseolus vulgaris*). Journal of Agriculture (Puerto Rico) 75(4): 353-361.
- SINGH, S. P. 1991. Breeding for seed yield. In Common beans. Research for crop improvement. Ed. by A. van Schoonhoven and O. Voysest. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p.383-384.
- SINGH, S. P.; CAJIAO, C.; GUTIERREZ, J. A.; GARCIA, J.; PASTOR-CORRALES, M.A.; MORALES, F.J. 1989. Selection for seed yield in inter-gene pool crosses of common bean. Crop Science (EE.UU) 29 (5): 1126:1131.
- SMARTT, J. 1970. Interspecific hybridization between cultivated american species of the genus *Phaseolus*. Euphytica (Holanda) 19: 480-489.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1985. Media and staining solutions. Appendix 3. In Methods in Legume-Rhizobium technology. Hawaii NifTAL Project and MIRCEN Hawaii. Paia, Maui, Hawii (EE. UU.), USAID. p. 273-280.

- STRAND, A. B. 1942. Species crosses in the genus *Phaseolus*. *Proceedings for the American Society for Horticultural Science* (EE.UU.) 42: 569-573.
- THOMAS, C.V.; WAINES, J.G. 1984. Fertile backcross and allotetraploid plants from crosses between tepary beans and common beans. *The Journal of Heredity* (EE.UU.) 75: 93-98.
- THUNG, M. 1991. Water managment. *In Common beans. Research for crop improvement*. Ed. by A. van Shoonhoven and O. Voysest. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p.745-748.
- WAINES, J.G.; MANSHARDT, R.M.; WELLS, W.C. 1988. Interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius*. *In Genetic resources of Phaseolus beans*. Ed. by P. Gepts. Kluwer Academic Publishers. p. 485-502.
- WHITE, J. W.; IZQUIERDO, J. 1989. Frijol: Fisiología del potencial del rendimiento y la tolerancia al estrés. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Santiago, Chile. p.53.
- YOUNG, R. A.; ALAN, J. J.; ROSAS, J. C. 1988. Mejoramiento del germoplasma hondureño de frijol *Phaseolus vulgaris* L. a través de la hibridación interespecífica. *In Reporte Anual de Investigaciones*. Ed. por J.C. Rosas. Departamento de Agronomía, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. p. 24-26.

BIOGRAFIA DEL AUTOR

Nombres:

Luis Rodrigo Pérez Camacho

Lugar y fecha de nacimiento:

Cochabamba, Bolivia. 14 de Julio de 1971.

Dirección:

Apartado postal # 857
Plazuela Aranjuez # 505
Tel. (591) (42) 42537
Cochabamba - Bolivia.

Educación secundaria y título obtenido:

Colegio Anglo Americano (1976- 1988), Cochabamba, Bolivia.
Bachiller en Ciencias y Letras.

Educación superior y título obtenido:

Escuela Agrícola Panamericana (1990 - 1992), El Zamorano, Honduras.
Agrónomo.