



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado

 CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Evaluación de la colección nuclear de judía frente a un aislamiento
local de *Phoma exigua* var. *diversispora*



César Omar Ferreira Rodríguez
21 de junio de 2013

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Evaluación de la colección nuclear de judía frente a un
aislamiento local de *Phoma exigua* var. *Diversispora*.

César Omar Ferreira Rodríguez

Firma

Dra. Elena Pérez-Vega

Dr. Juan José Ferreira Fernández

Firma

Firma

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, por siempre apostar por mi formación, aún después de tu partida has proporcionado para que nunca me falte el pan del conocimiento, siempre recuerdo que me decías "Serás lo que quieras ser". Gracias infinitas.

A mi madre. Eres la persona que más admiro, eres incansable, entregada y siempre crees en mí. No puedo pedirte más. Sin tu apoyo éste (mi proyecto) no hubiese sido posible, tienes un corazón cinco estrellas.

A la Dra. Elena Pérez-Vega, tutora de este proyecto, por aportarme toda la ayuda que necesité, por ser mi guía y confiar en mí.

Al Dr. Juan José Ferreira Fernández, por ser cotutor de este proyecto y facilitarme material, información, espacio y tiempo para desarrollar este proyecto.

A Montse, por tener que soportar compartir conmigo el banco de semillas y orientarme como estaban y como había que colocarlos (como los Alemanes).

Al personal de campo del SERIDA que siempre tenían el material de siembra listo y las cámaras casi impolutas.

Al equipo directivo y los profesores del Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales, por aportar sus diversos conocimientos, novedosos y útiles.

Por supuesto y sin duda alguna a Clara por ser mi "chofera" a la Villa (perdón por quitarte horas de canto a solas en tu coche, me debes una ópera).

Y como olvidar a mis compañeros de máster, fue un placer haberles conocido y compartir con ustedes parte del capítulo de la vida de estudiante.

Este trabajo ha sido financiado en parte gracias a los proyectos de investigación RTA2011-0076-CO2-01 y RF2010-00005-C05-02

RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen

Ascochyta, es una enfermedad causada por el hongo *Phoma exigua* var. *diversispora* que ataca los cultivos locales de judía común (*Phaseolus vulgaris* L). En este trabajo se investigó la reacción de 200 entradas de judía incluidas en Colección Nuclear Española y 10 líneas de judía utilizadas como referencia para las evaluaciones frente a este patógeno. Las inoculaciones se realizaron bajo condiciones controladas y los síntomas se evaluaron con una escala de severidad de 1-9. El análisis de varianza mostró diferencias significativas para las dos variables principales (genotipos y tests) así como para la interacción entre genotipos y tests. Sin embargo, se detectó una correlación significativa en las respuestas entre tests. Un total de 14 de las entradas mostraron altos niveles de resistencia frente a este aislamiento. Se llevarán a cabo pruebas de resistencias adicionales y el desarrollo de líneas a partir de estas entradas, con el fin de verificar estos resultados.

Abstract

Ascochyta blight, caused by the fungus *Phoma exigua* var. *diversispora* is a common disease in the local crops of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). In this work we investigated the reaction of 200 bean accessions included in a core collection and 10 well-known beans against a local isolate of this pathogen using a resistance test in controlled conditions. A 1-9 severity scale was used to score the reactions. Analysis of variance revealed a significant variation due to the main variables (genotypes and tests). However, a significant correlation was detected in the response among tests. A total of 14 accession exhibited high level of resistance to this isolate. Additional resistance tests and the development of lines from these accessions would be carried out in order to verify these results.

ÍNDICE

• 1. Introducción.	1
1.1 La judía común.	1
1.2 Diversidad genética de la especie.	2
1.3 Colección nuclear de judías.	2
1.4 Phomopsis o 'Ascochyta'.	4
1.5 Objetivos.	6
• 2. Materiales y métodos.	6
2.1 Materiales vegetales.	6
2.1.1. Colección nuclear de judía del CRF.	6
2.1.2. Genotipos de referencia.	6
2.2 Tests de resistencia.	7
2.2.1. Aislamiento del patógeno.	7
2.2.2. Procedimiento de inoculación.	7
2.2.3 Valoración de síntomas.	8
2.2.4 Análisis de los resultados.	9
• 3. Resultados.	10
3.1. Respuestas observadas.	10
3.2 Variación en la respuesta.	11
3.3 Potenciales fuentes de resistencia.	11
3.4. Correlaciones respuesta diversas enfermedades fúngicas.	13
• 4. Discusión.	14
• 5. Conclusiones.	17
• 6. Referencias.	18

1. Introducción

1.1. La judía común

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa anual herbácea perteneciente a la familia Leguminosae - Papilionoideae (Freytag y Debouck 2002). Esta especie presenta una germinación epígea. Las hojas de la planta adulta son compuestas, alternas y trifoliadas. El tallo es delgado y está formado por nudos y entrenudos en número y longitud variables. Las flores son papilionáceas y están organizadas en racimos axilares o terminales. Cada flor está compuesta por una quilla espiral formada por dos pétalos fusionados, dos pétalos laterales denominados alas y un quinto pétalo, llamado estandarte, orientado hacia el exterior. Las alas y el estandarte presentan una amplia variación en el color y en la distribución del color siendo los tipos principales el blanco, lila y violeta. La quilla envuelve el gineceo y el androceo favoreciendo el contacto de las anteras y el estigma. Cada flor tiene diez estambres y un único ovario que contiene varios óvulos o primordios seminales (Freytag y Debouck 2002). La fecundación es generalmente de tipo autógama, es decir, las flores se autopolinizan. En las condiciones de cultivo de Asturias la tasa de alogamia se ha estimado en menos del 0,74% (Ferreira et al 2000). Tras la fecundación, el ovario crece formando una vaina que contiene un número variable de semillas. Las semillas son exalbuminosas y la cubierta o testa es de origen materno (Debouck e Hidalgo 1985).

La judía común permite varios tipos de aprovechamiento para la alimentación humana y dependiendo de la variedad/genotipo se consumen las semillas o las vainas. Las semillas secas se consumen cocidas después de una rehidratación (judía seca) o tostadas (nuñas). En ocasiones, las semillas también pueden aprovecharse antes de su deshidratación en la vaina (semillas inmaduras o pochas). Las vainas se pueden consumir antes de que comiencen a desarrollarse las semillas, es decir, en vaina inmadura (judía verde o fréjoles). Existen diversos modos de comercialización de las semillas, como son en forma de semillas secas envasadas, precocinadas, congeladas o en platos elaborados. Las vainas también pueden comercializarse frescas, precocinadas o congeladas.

En España, la judía se cultiva, principalmente, para producir semilla o vaina verde. En la campaña de 2011, este cultivo ocupó una superficies de 6.989 y 8.939 ha, respectivamente (datos Avance Anuario de Estadística 2012 <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/>).

La producción de judía seca en España se centra en el noroeste de la Península Ibérica (Castilla y León, Galicia), mientras que la producción de judía verde, tradicionalmente considerada como un cultivo hortícola intensivo, se centra en la zona mediterránea. En lo que respecta a judía seca, se considera un cultivo tradicional que representa para muchas regiones un importante recurso socioeconómico. Éste es el caso del cultivo del tipo Fabada o Faba granja Asturiana en Asturias que, además dispone de la marca de calidad Indicación Geográfica Protegida 'Faba Asturiana' (Ferreira et al 2005). En lo que respecta al aprovechamiento en vaina verde, la judía es una de las hortalizas más importantes cultivadas en España. Este cultivo supuso hace unas décadas el 5% de la superficie total dedicada a hortalizas en España (López y Rodríguez 1976). Actualmente, se cultiva fundamentalmente en regadíos y al aire libre pero también en determinadas zonas, se cultiva en secano o bajo plástico. A fecha de diciembre de 2012, se habían registrado 8.939 hectáreas con una producción de 152.507 toneladas, mostrando un aumento oscilante en la producción en estos últimos años. La zona de mayor producción es Andalucía Oriental, que ocupa casi la totalidad de su producción, seguido por Levante y por Cataluña (Avance Anuario de Estadística 2012 <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/>).

1.2. Diversidad genética de la especie

Diferentes estudios han puesto de manifiesto, tanto en el material domesticado como en el material silvestre, dos grupos principales de germoplasma o acervos genéticos dentro de *Phaseolus vulgaris* L.: germoplasma andino y el germoplasma mesoamericano. Estos dos grupos de germoplasma están asociados con dos áreas geográficas del continente americano donde probablemente tuvieron lugar dos eventos paralelos de domesticación; Colombia, Perú y Ecuador en la región andina y México en la región mesoamericana (Singh et al 1991).

La judía común una especie extraordinariamente polimórfica y se han descrito numerosas variedades considerando los fenotipos de semilla, vaina, flor o hábito de crecimiento de la planta (Voyses 2000; Ferreira et al 2005; Pérez-Vega 2009).

1.3 Colección nuclear de judías

El Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF-INIA, Madrid; <http://www.inia.es/crf>), dentro de la red española de colecciones de semilla, es el responsable de mantener el inventario nacional y de conservar las colecciones base (conservación a largo plazo) de las especies con semillas ortodoxas. Este Centro mantiene también, colecciones activas (conservación a medio plazo) de algunos grupos de cultivos, entre los que se

incluye la judía común. Además, la mayor parte de las entradas conservadas en la red de bancos de germoplasma españoles también están conservadas en el Centro de Recursos Fitogenéticos-INIA (CRF-INIA). Actualmente el CRF-INIA dispone de 3.328 entradas de la especie *Phaseolus vulgaris* L. de ellas, 2.947 se han recolectado en España (<http://www.inia.es/crf>). Además de esta colección central, en España existen otras colecciones de germoplasma de judía, entre las que cabe destacar la colección activa mantenida en el SERIDA (Villaviciosa, Asturias), constituida por 381 entradas (procedentes principalmente de la Cornisa Cantábrica) que incluye dos especies del género *Phaseolus* spp: *Phaseolus vulgaris* L., 370 entradas, y *Phaseolus coccineus* L., 11 entradas (Ferreira et al 2005).

El manejo de amplias colecciones de germoplasma plantea serias dificultades a la hora de gestionar y utilizar los recursos fitogenéticos y para solventar estos problemas se establecen las colecciones nucleares. Una colección nuclear es un juego de entradas con un mínimo de repeticiones, constituido para representar la diversidad reunida dentro de una colección de germoplasma (Frankel 1984; Brown 1995). La utilidad de una colección nuclear es amplia y representa el juego de entradas que son preferentemente utilizadas en los trabajos de evaluación (van Hintum et al 2000).

En el año 2000, (De la Rosa et al 2000) proponen una colección nuclear de 211 entradas para la colección de *P. vulgaris* L. (ver Figura 1) reunida en aquel momento en el CRF-INIA (2287 entradas). Esta colección se estableció a partir del análisis de los datos de pasaporte (provincia, localidad y altura sobre el nivel del mar del lugar de recolección) y de fenotipo de semilla (color, forma y tamaño). En el año 2003, un duplicado de esta colección nuclear se transfirió al SERIDA con el objeto de profundizar en su conocimiento y utilización desde diferentes puntos de vista. Hasta el momento los trabajos llevados a cabo en el SERIDA en esta colección han sido:

- Caracterización morfológica de todas las entradas en el mismo ambiente, en base a 31 descriptores cualitativos (Pérez Vega et al 2006; Pérez-Vega et al 2009).
- Caracterización asistida por proteínas de semilla incluyendo la faseolina, marcador de gran interés evolutivo en esta especie; (Pérez-Vega et al 2009).
- Evaluación de la respuesta frente a las razas de *Colletotrichum lindemuthianum* 3, 6, 38, 19 y 102 (agente causal de la antracnosis; Pérez-Vega et al 2006).
- Evaluación de la respuesta frente a un aislamiento local de *Sclerotinia sclerotiorum* (agente causal del moho blanco; Pascual et al 2010).

- Análisis de la diversidad genética reunida en esta colección utilizando 11 marcadores moleculares (Pérez-Vega et al 2009).

Todos los resultados han confirmado la existencia de una amplia variación dentro del juego de entradas que integran la colección nuclear tanto a nivel morfológico como molecular.

Figura 1. Diversidad de los fenotipos de semilla presentes en la colección nuclear de judías del CRF. Cada semilla representa una entrada de esta colección.



1.4 Phomopsis o 'Ascochyta'

El hongo *Phoma exigua* causa daños en un amplio rango de plantas como el tomate, el pimiento o la lechuga. En judía común, la forma especializada *Phoma exigua* var. *diversispora* (Bubak) es la causante una enfermedad conocida como phomopsis, en inglés 'ascochyta blight' (Boerema et al 1981; Schwartz et al 2005). El hongo tiene una amplia distribución mundial, destacando su presencia en aquellas regiones donde se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo: temperatura moderadas (entre 15°C y 20°C) y elevada humedad ambiental (entre 80% y 100%). En Europa se ha constatado su presencia en el cultivo de judía en Alemania y Holanda (Boerema et al 1981). En Asturias, en las últimas campañas de cultivo se han incrementado los síntomas de esta enfermedad causando pérdidas en la producción y afectando particularmente, al cultivo de 'Faba Granja Asturiana'.

Los síntomas característicos de este patógeno (ver Figura 2) aparecen en cualquier parte aérea siendo particularmente visibles en las hojas, nudos de los tallos y vainas. Las lesiones características son chancros circulares de color marrón formados por

círculos concéntricos. En estados avanzados de la enfermedad, se pueden observar en el interior de los chancros, pequeños puntos negros que son los picnidios que produce el hongo. En ataques severos de la enfermedad puede provocar una defoliación prematura o muerte de la planta, especialmente cuando los ataques tienen lugar sobre los dos primeros nudos de las plantas. En este caso, los ataques conducen a la muerte de la planta antes de la finalización del periodo de floración. El hongo puede transmitirse por semilla (Boerema et al 1981; Schwartz et al 2005).



Figura 2. Síntomas característicos causados por *Phoma exigua* en tallo, hojas y vainas de judía, tipo faba granja asturiana.

Los métodos para el control de la enfermedad pueden ser de dos tipos: métodos convencionales que incluyen diferentes técnicas de manejo del cultivo o la utilización de variedades resistentes. Las prácticas culturales recomendadas para el control de *P. exigua* son: la rotación de cultivos, la retirada de restos de cultivos (donde puede sobrevivir el hongo), la desinfección de las semillas ya que puede transmitirse a través de ellas y la aplicación de fungicidas autorizados (Schwartz et al 2005). Hay que tener en cuenta que la aplicación de tratamientos fitosanitarios supone un aumento de los costes finales del cultivo y es un factor negativo si se pretende realizar un cultivo sostenible. Además, desde la administración europea se fomenta cada vez más, el desarrollo de cultivos saludables y respetuosos con el medio ambiente por lo el número de materias activas autorizadas es más limitado. En el caso concreto de *P.*

exigua, que es un patógeno emergente en España, no se contempla desde el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente ninguna materia activa para su control. La utilización de variedades resistentes supone por tanto, una solución práctica y sencilla para el agricultor además de favorecer un cultivo saludable y medioambientalmente sostenible. Sin embargo, no se han dedicado muchos esfuerzos al estudio de la interacción entre este patógeno y la judía común por lo que hay una significativa carencia de información para plantear un posible programa de mejora genética.

1.5 Objetivos

En los últimos años se ha constatado un incremento de ataques severos de *P. exigua* en los cultivos locales de 'Faba Granja Asturiana' que están provocado una disminución del rendimiento del cultivo. Antes de plantear un posible programa de mejora genética orientado a incrementar la resistencia frente a este patógeno en 'Faba Granja Asturiana', es necesario disponer de un test para evaluar la respuesta de *P. vulgaris* al ataque por el patógeno *P. exigua*. En este contexto, los objetivos específicos de este trabajo han sido:

- Evaluar la consistencia del test de resistencia y la escala de evaluación de daños.
- Conocer la respuesta del germoplasma local español incluido dentro de la colección nuclear de judía del CRF frente a un aislamiento local de *P. exigua* para identificar potenciales factores de resistencia.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales vegetales

2.1.1. Colección nuclear de judía del CRF

En este trabajo se evalúa la respuesta de las entradas que constituyen la colección nuclear de judías CRF-INIA. Esta colección nuclear la integran 211 entradas locales recolectadas en España aunque para este trabajo sólo estaban disponibles 200 entradas (Pérez-Vega et al 2009). Todas las entradas fueron multiplicadas en las instalaciones del SERIDA_Villaviciosa.

2.1.2. Genotipos de referencia

En cada evaluación se incluyeron diez líneas de judía reconocidas internacionalmente utilizadas como referencia para la caracterización de la agresividad del aislamiento: Xana, Cornell 49242, AB136, MDRK, Widusa, ICTA Hunapú, BRB130, JALO EEP 558, PI-207262 y Redlands Green Leaf C. Entre todas ellas ICTA Hunapú se considera un

genotipo con moderada resistencia a *P. exigua* en Guatemala (S. Beebe, CIAT, Cali, Colombia com. per.).

2.2 Tests de resistencia

2.2.1. Aislamiento del patógeno.

Se utilizó un aislamiento monoespórico (derivado de una conidia) denominado aislamiento Ph02 que se conserva en el Laboratorio de Genética Vegetal del SERIDA. Este aislamiento, se obtuvo a partir de tejido recolectado en una finca de Faba Granja Asturiana en la localidad de Arbón (Concejo de Navia, Asturias) de plantas que mostraban síntomas evidentes de la enfermedad. Se conserva en forma de conidias fijadas sobre papel de filtro a -20°C según describe (Castellanos et al 2011).

2.2.2. Procedimiento de inoculación

El hongo se multiplicó en placas petri que contenían medio Potato Agar Dextrose (PDA, DIFCO) en oscuridad a 22 °C durante 8-10 días. A partir de este cultivo se tomaron las conidias con la ayuda de una espátula y se diluyeron en agua. La inoculación de las plantas se llevó a cabo mediante pulverización con una solución de conidias. La concentración de esporas se ajustó con ayuda de un hematocitómetro, a 0.5×10^6 conidias por mililitro.



Figura 3. Crecimiento del aislamiento Ph02 de *Phoma exigua* sobre medio PDA.

Para llevar a cabo los test de resistencia, se sembraron ocho semillas de cada material en dos macetas de 1,5 l que contenían como sustrato turba y perlita en una proporción 70:30. Aproximadamente diez días después de la siembra, cuando las plántulas mostraban las hojas primarias totalmente expandidas y se iniciaba el desarrollo del tallo, las plántulas se pulverizaron con la solución de conidias anteriormente indicada. Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron durante 10-12 días en una cabina

instalada dentro de un invernadero con una humedad relativa entorno al 100% y una temperatura entre 18 y 22°C.

2.2.3 Valoración de síntomas

Para la valoración de los síntomas o daños se utilizó una escala de severidad 1-9 (ver Figura 4) adaptada de la descrita por Pande et al (2011) para la evaluación de esta enfermedad en garbanzo. En la Tabla 1 se describen los grados de severidad en la escala utilizada para valorar los síntomas considerando la presencia de lesiones en el tallo y en la hoja primaria. La Figura 4 muestra alguno de estos grados de severidad en plantas

Tabla 1. Escala de grados de severidad para evaluar la respuesta de las entradas frente al patógeno.

Grado de severidad	Descripción de síntomas
1	Sin síntomas visibles en toda la planta
3	Mínimas lesiones en hoja y/o tallos (< 3mm), ligera caída de ápice del tallo
5	Lesiones visibles en hojas y tallos, caída del ápice del tallo, nudos afectados e inicio caída hojas primarias
7	Lesiones severas en hojas (> 5mm), tallo y nudos y/o caída de la ambas hoja primarias. Lesiones severas en primer nudo que conduce a la muerte de la planta.
9	Planta colapsada o muerta

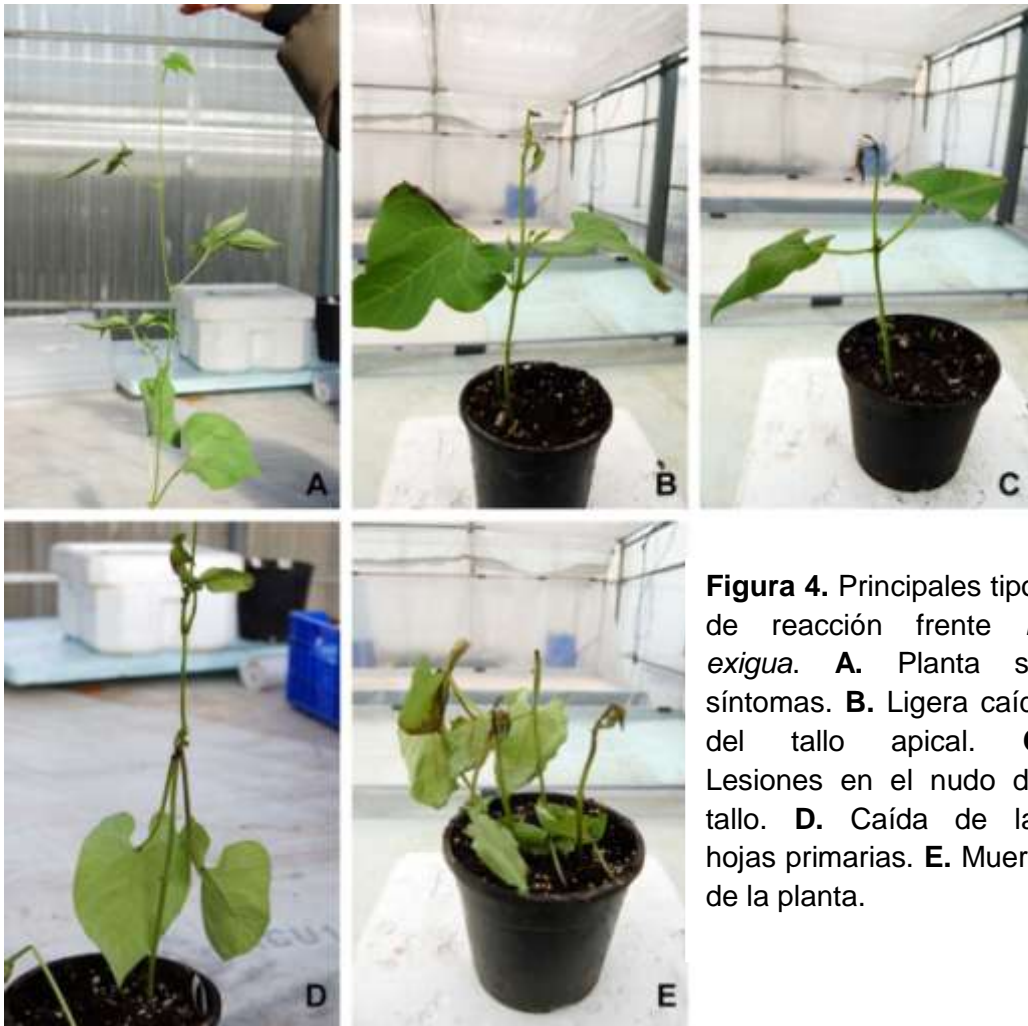


Figura 4. Principales tipos de reacción frente *P. exigua*. **A.** Planta sin síntomas. **B.** Ligera caída del tallo apical. **C.** Lesiones en el nudo del tallo. **D.** Caída de las hojas primarias. **E.** Muerte de la planta.

2.2.4 Análisis de los resultados

Para investigar la respuesta de cada material, se realizaron tres diferentes tests de resistencia. En cada test de resistencia había dos macetas de cada material distribuidos al azar. A partir de la respuesta de cada planta se estimó la respuesta media por unidad experimental (maceta con 4 plantas). A partir de la respuesta media de cada maceta en los tres tests se estimó la respuesta de cada material frente al aislamiento.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA multivariante) con objeto de conocer la significación de las principales fuentes de variación: genotipos, tests e interacción genotipo x tests. Así mismo, se investigó la correlación en la respuesta entre tests y entre la respuesta a diferentes patógenos para los que la colección nuclear ha sido evaluada. El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa SPSS V13.

3. Resultados

3.1. Respuestas observadas

Transcurridos 10-12 días, después de realizar la inoculación, se observaron tres tipos de lesiones en las plantas de judía con diferentes grados de intensidad y que pueden afectar a la viabilidad de la planta en mayor o menor grado (ver Figura 5);

- i) Lesiones necróticas de color castaño oscuro en la yema terminal tallo que en casos extremos conduce a la muerte de esta zona del tallo.
- ii) Lesiones de color castaño oscuro formando círculos concéntricos sobre las hojas que puede evolucionar hacia la ruptura del limbo en el área lesionada. Estas mismas lesiones también fueron observadas en los entrenudos del tallo o pedúnculo de la hoja.
- iii) Lesiones necróticas de color castaño oscuro sobre los nudos del tallo (en la unión del pedicelo con el tallo) y en el nudo de la base de la hoja (en la unión de la hoja con el pedicelo). Estas lesiones sobre los nudos conducen en caso extremos a la defoliación y muerte de la plantas, particularmente cuando afectan al primer nudo (nudo de los cotiledones).

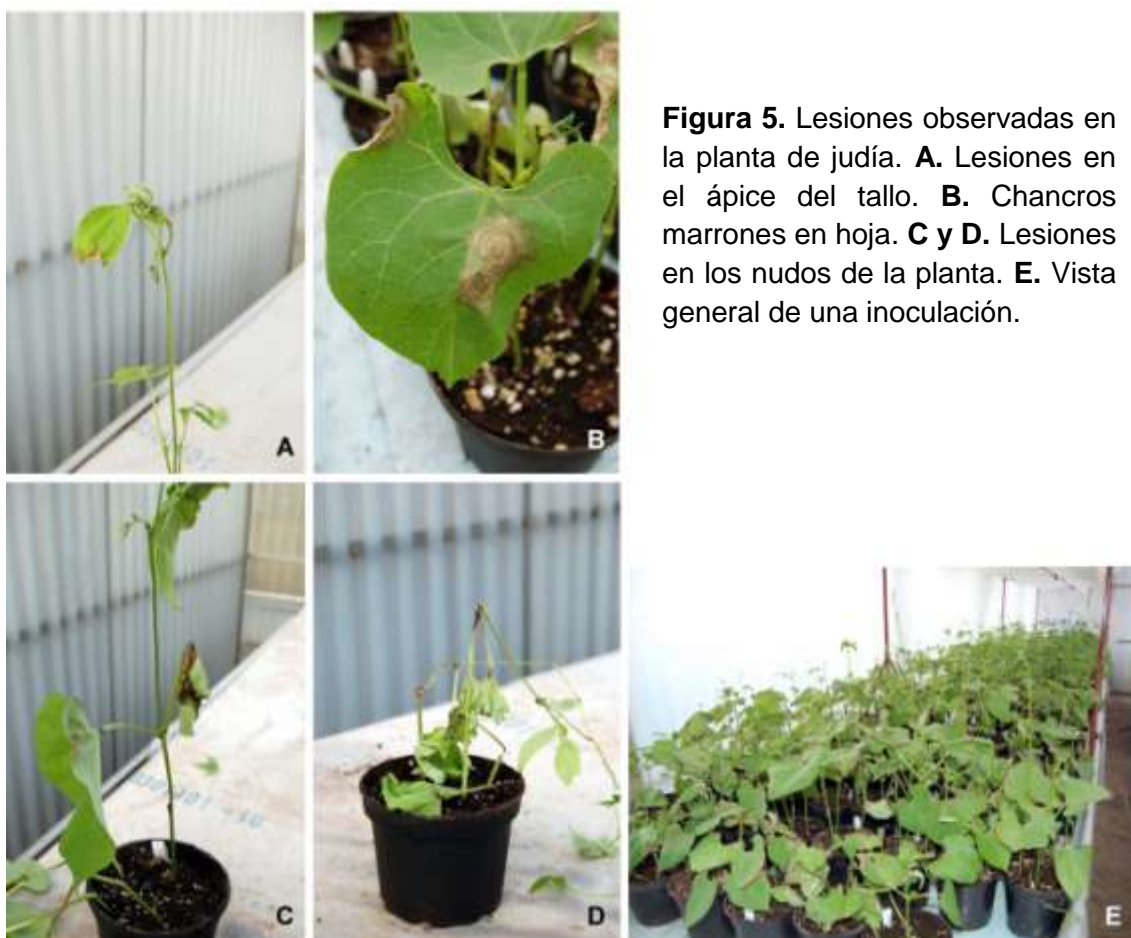


Figura 5. Lesiones observadas en la planta de judía. **A.** Lesiones en el ápice del tallo. **B.** Chancros marrones en hoja. **C y D.** Lesiones en los nudos de la planta. **E.** Vista general de una inoculación.

3.2 Variación en la respuesta

En este trabajo se evaluaron 210 entradas o variedades de judías en tres ensayos diferentes que incluyen cada uno dos repeticiones (macetas). Se observó variación en la respuesta de las entradas y variedades dentro de test y entre tests aunque generalmente la respuesta de un material se mantenía dentro de un mismo rango de severidad. El análisis de varianza mostró diferencias significativas para las dos variables principales (genotipos y test) así como para la interacción entre genotipos y tests (Tabla 2). Por su parte, el análisis de correlaciones entre tests de resistencia reveló una correlación significativa ($r=0.199$ y $p<0.001$).

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza para tres ensayos de resistencias en los que se evalúa la respuesta de 210 genotipos frente a un aislamiento local de *P. exigua* (Ph02).

Fuente	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Genotipos	209	5,145	1,253	,028
Tests	2	228,278	55,879	,000
Genotipos x Tests	412	4,114	3,540	,000

3.3 Potenciales fuentes de resistencia

A partir de los resultados reunidos en los tres tests desarrollados se estimó la respuesta media de cada entrada o variedad. La Figura 6 representa la distribución de la respuesta frente al aislamiento Ph02 de *P. exigua* en las 210 entradas o variedades de judía (evaluadas con una escala 1-9). No se encontraron materiales totalmente resistentes dentro de las entradas ni de las variedades testadas, es decir, genotipo sin síntomas de la enfermedad (severidad 1). No obstante, un porcentaje pequeño de los materiales (6,6%) mostraron altos niveles de resistencia con un índice de severidad medio entre 3 y 4, esto es, con mínimas lesiones en hoja y entrenudos (< 3 mm) y ligera necrosis de ápice del tallo. Estas catorce entradas de la colección nuclear presentaron un índice de severidad en la respuesta a este aislamiento en al menos dos de los tres ensayos realizados. Las principales características de las catorce entradas que mostraron estos mayores niveles de resistencia se indican en la Tabla 3. La mayor parte de las 14 entradas con elevados niveles de resistencia mostraron características típicas del grupo de germoplasma andino: semillas grandes y tipo de faseolinas T o S. En este grupo de entradas se identificaron 9 diferentes clases comerciales de semilla (Tabla 3).

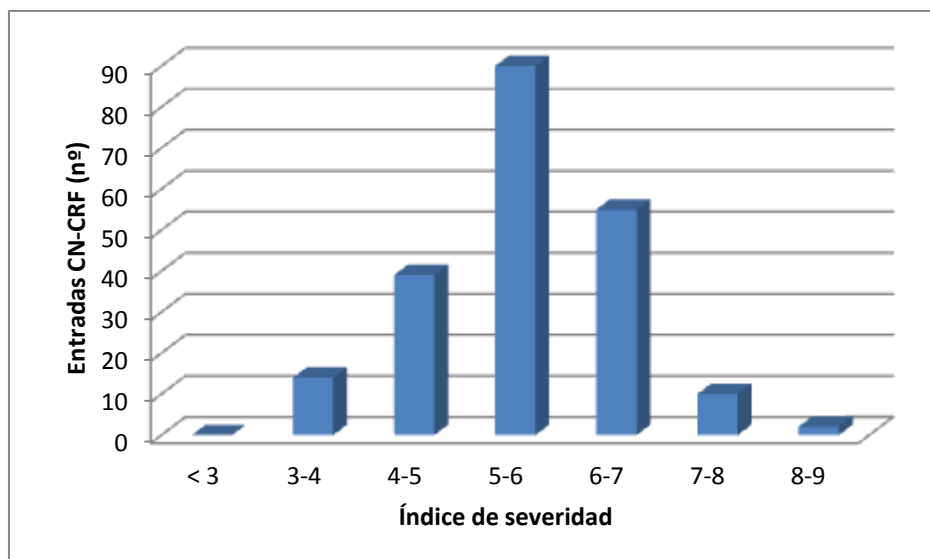


Figura 6. Distribución de las 210 entradas o variedades de judías evaluadas para su reacción frente a un aislamiento de *P. exigua*.

Tabla 3. Principales características de las entradas de la colección nuclear de judías que presentaron los mayores niveles de resistencia frente a un aislamiento local. Junto con la respuesta media al aislamiento de *P. exigua*, se indican caracteres de interés de las entradas como el tipo de faseolina, el hábito de crecimiento y la clase comercial de su semilla, así como el peso y tamaño de las semillas, obtenido a partir de la base de datos de la colección nuclear del CRF-INIA.

Accesión*	Grado de severidad medio	Error	Clase comercial**	Hábito de crecimiento	Tamaño semilla	Peso de 100 semillas (g)	Tipo de Faseolina
BGE003550	3,3	± 0,9	Canellini	3	Mediana	41,8	T
BGE011060	3,3	± 0,8	Rounded caparron	3	Pequeña	38,0	C
BGE003404	3,5	± 1,1	Marrow	3	Mediana	52,0	T
BGE002016	3,5	± 0,6	Rounded caparron	3	Grande	67,3	C
BGE011037	3,5	± 0,5	Marrow	3	Mediana	55,0	T
BGE011023	3,5	± 0,6	Negro brillante	4	Mediana	41,0	C
BGE002152	3,7	± 0,5	Great nothern	3	Grande	61,8	T
BGE004453	3,7	± 0,9	Small yellow	1	Pequeña	33,8	S
BGE003562	3,7	± 1,0	Negro brillante	3	Mediana	50,8	C
BGE004435	3,7	± 1,2	Small yellow	3	Mediana	52,8	S
BGE011021	3,9	± 0,9	Black turtle	1	Pequeña	26,5	S
BGE003122	3,9	± 0,5	Kidney caparron	3	Grande	55,5	C 1
BGE008987	3,9	± 0,7	Marrow	3	Mediana	50,3	T
BGE026163	4,0	± 0,4	White kidney	3	Mediana	45,3	T

* Entradas con un grado de severidad medio < 4

** De acuerdo con la clasificación propuesta por (Santalla et al 2001).

La mayor parte de los materiales (42%) mostraron una respuesta intermedia con un índice de severidad medio entre 5 y 6, esto es, las plantas exhibían lesiones visibles en hojas y entrenudos asociados generalmente a caída del ápice del tallo o nudos afectados con inicio de defoliación. En lo que respecta a las variedades de referencia evaluadas, la respuesta media se describe en la Tabla. 4. Con excepción de la variedad Cornell 49242, todas ellas mostraron una respuesta intermedia (Tabla 4).

Tabla 4. Respuesta media de las 10 variedades usadas como referencia en los test de resistencias llevados a cabo.

Variedad	Grado de severidad medio	Error
Xana	5,4	0,58
Cornell 49242	7,1	0,65
AB136	4,5	0,53
MDRK	5,8	0,47
ICTA Hunapu	5,0	0,57
BRB130	4,7	0,98
JALO EEP 558	4,6	0,88
PI-207262	4,8	0,60
Redlands Green Leaf C	4,8	0,80
Widusa	5,4	0,50

3.4. Correlaciones entre la respuesta diversas enfermedades fúngicas

En trabajos previos, se evaluó la respuesta de las entradas que constituyen la colección nuclear de judía, frente a diferentes patógenos. La tabla 5 muestra las correlaciones entre la respuesta al aislamiento Ph02 de *P. exigua*, cinco razas locales de *Colletotrichum lindemuthianum* (razas 3, 6, 19, 38 y 102), un aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y un aislamiento de *Pythium ultimum*. Se encontraron correlaciones altamente significativas entre las cinco razas de antracnosis. Además, este análisis reveló una correlación significativa entre la respuestas al aislamiento Ph02 analizado en este trabajo y la respuesta frente a *Pythium ultimum* en germinación ($r = 0.24$, $p < 0.001$).

Tabla 5. Análisis de las correlaciones realizadas en la CN-CRF, entre cinco aislamientos locales de antracnosis *Colletotrichum lindemuthianum* (razas 38, 102, 3, 6 y 19), un aislamiento de moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), un aislamiento de *Pythium ultimum* (vigor de las plantas y germinación de las semillas) y *P. exigua*.

	Antracn osis (Raza 38)	Antracn osis (Raza 102)	Antracn osis (Raza 3)	Antracn osis (Raza 6)	Antracno sis (Raza 19)	Moho blanco (Aisl.02)	Pythiu m. Germ. (Aisl. Pu03)	Pythiu m. Vigor (Aisl. Pu03)	Ascoc hyta (Aisl. Ph02)
Antracnosis (Raza 38)	1								
Antracnosis (Raza 102)	-0,21*	1							
Antracnosis (Raza 3)	0,31**	0,11 ns	1						
Antracnosis (Raza 6)	0,32**	0,07 ns	0,06 ns	1					
Antracnosis (Raza 19)	0,20**	0,20**	0,79 **	0,05 ns	1				
Moho blanco (Aisl.02)	-0,25**	0,31**	-0,08 ns	-0,05 ns	-0,02 ns	1			
Pythium (Aisl. Pu03)	-0,06 ns	-0,07 ns	0,07 ns	-0,22**	0,04 ns	-0,04 ns	1		
Pythium (Aisl. Pu03)	-0,13 ns	-0,05 ns	-0,01 ns	-0,03 ns	0,00 ns	-0,07 ns	0,53 **	1	
Ascochyta (Aisl. Ph02)	-,034	-,063	0,07 ns	-0,03 ns	0,08 ns	-0,06 ns	0,24 **	0,07 ns	1

ns, no significativo ($p > 0.05$); * $0.01 > p < 0.05$; **, $p < 0.01$

4. Discusión.

Se evaluaron un total de 210 entradas o variedades de judía en tres tests o evaluaciones diferentes. En las investigaciones previas a este trabajo no se encontraron referencias en las que se llevasen a cabo test de resistencia en condiciones controladas frente a este patógeno en judía común. Schwartz et al (1981), Schmit y Boudoin (1992) y Hanson et al (1993) analizaron la resistencia en judía frente a este patógeno en campo. En estos cultivos, las variables que afectan a la interacción planta-patógeno son altamente variables y difíciles de controlar; fotoperiodo, humedad, temperatura, nutrición de la planta, estados fisiológico de la planta, fuente del patógeno.

El test de resistencia utilizado en este trabajo, se adaptó del método que se aplica frecuentemente para evaluar la respuesta frente a *Colletotrichum lindemuthianum*, hongo responsable de la enfermedad conocida como antracnosis (Ferreira et al 2008). Ambos patógenos se multiplican bien sobre medio PDA y producen abundantes conidias. El test de resistencia bajo condiciones controladas permite un mayor control

de las condiciones respecto a los test llevados a cabo en condiciones de campo. Así, por ejemplo, se puede controlar la fuente del patógeno en cuanto a concentración, pureza y origen. Además, este tipo de evaluaciones requiere menores medios y ofrece la posibilidad de conocer la respuesta de los genotipos en fases tempranas, sin requerir todo el desarrollo del cultivo.

La escala de severidad para calificar el nivel de daños fue adaptada de la escala descrita por Pande et al (2011) para garbanzo. Esta escala permite clasificar con relativa objetividad el nivel de daños observados en las plantas sin tener que recurrir a mediadas más complejas utilizada en otras especies como el número y tamaño de las lesiones o porcentaje de superficie de la planta afectada (Ávila et al 2004).

Los resultados ponen de manifiesto la existencia de variación en la respuesta tanto en la variable genotipo como en la variable test, esta variación es esperable dada la diversidad de genotipos reunida en la colección nuclear. Diferentes factores que pueden afectar a la respuesta en la interacción planta-patógeno; pueden deberse al patógeno, a la planta, o al ambiente (triángulo de la enfermedad). La fuente de inóculo utilizada fue un asilamiento local monospórico, esto es derivado de una conidia, por lo que no se espera que la variación en la respuesta sea debida al patógeno. En cuanto a la planta, las accesiones de la colección nuclear derivan de muestras recogidas a los agricultores y conservadas en la colecciones de semillas. Por lo tanto, una entrada puede tener cierta heterogeneidad debida a la presencia de mezcla de varias líneas que pueden responder de un modo diferente frente al patógeno. Finalmente en lo que respecta al ambiente, debido al volumen de plantas manejadas (aproximadamente 1680 en cada test), los tests de resistencia se realizaron en cabinas instaladas dentro de invernaderos donde el control de la temperatura y humedad presenta cierta oscilación. En cualquier caso, la variación observada entre tests sugiere la necesidad de llevar a cabo varias evaluaciones para disponer de una buena estimación de la respuesta de los materiales.

En lo que respecta a la respuesta de las entradas y variedades, los resultados indicaron que se trata de una respuesta de naturaleza cuantitativa, esto es, una respuesta continua en la que no se pueden establecer clases fenotípicas tales como resistente (sin síntomas) y susceptible (plantas muy afectadas o muertas). Esto sugiere que el control genético de la respuesta en los genotipos con mayores niveles de resistencia puede estar contralado por QTL (quantitative trait loci), es decir, varios genes con pequeño efecto sobre el fenotipos e influenciados por el ambiente (Collard

et al 2005). Esta posibilidad encaja con el control genético descrito en otras especies de leguminosas (Muehlbauer y Chen 2007).

El juego de entradas incluidas en la colección nuclear de judías también se había evaluado frente a cinco razas locales de *Colletotrichum lindemuthianum* (razas 3, 6, 19, 38 y 102; Pérez Vega et al 2006), un aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Pascual et al 2010) y un aislamiento de *Pythium ultimum* (Campa et 2010). El análisis de correlaciones entre la respuestas al aislamiento de Ph02 analizado en este trabajo y la respuesta frente a otros patógenos reveló una correlación significativa con la respuesta *Pythium ultimum* ($r=0.244$ $p<0.001$). La existencia de correlación significativa podría indicar que las mismas regiones genómicas están implicadas en el control de ambos caracteres, aunque esta hipótesis debería ser investigada mediante un análisis de QTL en poblaciones segregantes.

Los resultados de este trabajo permitieron identificar 14 entradas de la colección nuclear con elevados niveles de resistencia con un índice de severidad menor de 4 en al menos dos de los tres tests llevados a cabo. Todas estas accesiones mostraban mínimas lesiones 10 días después de la inoculación. Este resultado es coherente con los bajos niveles de resistencia frente a este patógeno encontrados en *P vulgaris* aunque el número de genotipo evaluados fue reducido (Schwartz et al 1981; Hanson et al 1993). Por contra, altos niveles de resistencia se encontraron en especies próximas a *P vulgaris* como *P. coccineus* y *P. dumosus* (Schmit y Baudoin 1992). La respuesta de estas accesiones debería confirmarse en posteriores evaluaciones. Esta verificación podría incluir la realización de nuevos tests de resistencia y/o el establecimiento de líneas homocigotas y su posterior evaluación. En todo caso, este trabajo supone una primera aproximación al estudio de la interacción entre el hongo responsable de la enfermedad y la judía común.

5. Conclusiones

Este trabajo supone un primer esfuerzo en el estudio de la interacción *Phoma exigua* var *diversispora* - *Phaseolus vulgaris* L. Las primeras conclusiones que se pueden extraer son:

1. El test de resistencia permitió desarrollar la enfermedad en condiciones controladas. Los tipos de síntomas se repitieron entre evaluaciones y afectaron especialmente a los nudos.
2. La escala de evaluación para clasificar las reacciones de la planta resultó sencilla, fácil de utilizar y permitió identificar los diferentes niveles de respuesta.
3. Se detectó una variación significativa entre tests lo que aconseja realizar varias evaluaciones para obtener una buena estimación de la respuesta o nivel de resistencia de los genotipos.
4. Se detectó variación significativa entre genotipos de judía (entradas o variedades). Se identificaron 14 accesiones con elevados niveles de resistencia.
5. Los resultados indican una naturaleza cuantitativa de la respuesta frente a este patógeno. Dada esta naturaleza resulta conveniente verificar los niveles de resistencia de estas 14 entradas mediante nuevos test de resistencia o el establecimiento de líneas homocigotas para su posterior evaluación.

6. Referencias

- Ávila CM, Satovic Z, Sillero JC, Rubiales D, Moreno MT, Torres AM (2004) Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theor Appl Genet* 108:1071–1078.
- Boerema GH, Crüger G, Gerlagh M (1981). *Phoma exigua* var. *diversispora* and related fungi on Phaseolus bean. *Journal of Plant Diseases and Protection* 88: 597-607.
- Brown AHD (1995). The core collectons at the crossroads. En: Core collections of plant genetic resources. T Hodgkin, AHD Brown, THJL van Hintum, EAV Morales (Eds). John Wiley and Sons, Reino Unido. 3-19 pp.
- Campa A, Pérez-Vega E, Pascual A, Ferreira JJ (2010). Genetic Analysis and molecular mapping of quantitative trait loci in common bean against *Pythium ultimum*. *Phytopathology*: 100 1315-1320.
- Castellanos G, Jara C, Mosquera G (2011). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 232 pp.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*. 142: 169–196.
- De la Rosa L, Lázaro A, Varela F (2000). Racionalización de la colección española de *Phaseolus vulgaris* L. En: II Seminario de judías de la Península Ibérica. I Actas de la Asociación Española de Leguminosas. 55-62.
- Debouck D, Hidalgo R (1985). Morfología de la planta del frijol común. En: Frijol: Investigación y producción. López M, Fernández F., Schoonhoven A. (Eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, pp 7-41.
- Ferreira JJ, Álvarez E, Fueyo MA, Roca A, Giraldez R (2000). Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. *Euphytica* 113: 259-263.
- Ferreira JJ, Campa A, Pérez-Vega E (2005). Conservación y utilización de variedades tradicionales de faba en Asturias: Colección Activa de Judías del Principado de Asturias. Ed. SERIDA & KRK Ediciones. 91 pp
- Ferreira JJ, Campa A, Pérez-Vega E, Giráldez R (2008). Reaction of a bean germplasm collection against five Races of *Colletotrichum lindemuthianum* identified in northern Spain and implications for breeding. *Plant Dis* 92 705-708.
- Frankel OH (1984). Genetic perspectives of germoplasm conservation. En: Genetic manipulation: impact on man and society. W Arber, K Llimensee, WJ Peacock, P Starlinger (Eds). Cambridge University Press. 161-170 pp.

- Freytag GF, Debouck DG (2002). Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoidae) in North America, Mexico and Central America. En: SIDA (Eds). Botanical Miscellany 23, 298 pp.
- Hanson PM, Pastor-Corrales MA, Kornegay J (1993) Heritability and sources of ascochyta blight resistance in common bean. Plant Dis 77:711-714.
- López JM, Rodríguez A (1976). Variedades de judía para verdeo. Número 14-76. Hoja Divulgadora – Ministerio de Agricultura.
- Muehlbauer FJ, Chen W (2007) Resistance to ascochyta blights of cool season food legumes. Eur J Plant Pathol 119:135–141.
- Pande S, Shama M, Gur PM, Tripathi S, Kaur L, Basandrai A, Khan T, Gowda CLL, Siddique KHM (2011). Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to Ascochyta blight disease of chickpea. Australasian Plant Pathol. 149-156.
- Pascual A, Campa A, Pérez-Vega E, Giráldez R, Miklas PN, Ferreira JJ (2010). Screening common bean for resistance to four Sclerotinia sclerotiorum isolates collected in northern Spain. Plant Dis 94 885-890.
- Pérez-Vega E, Campa A, De la Rosa L, Giráldez R, Ferreira JJ (2009). Genetic diversity in a core collection established from the main bean genebank in Spain. Crop Sci 49 1377-1386.
- Pérez-Vega E, Fernández J, Campa A, De la Rosa L, Giráldez R, Ferreira JJ (2006). Validación de la colección nuclear de judías del CRF-INIA con la asistencia de caracteres morfológicos y proteínas de semilla. Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español. II Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas, pp 215-223.
- Santalla M, De Ron A, Voyset O (2001) European bean market classes. In: Catalogue of bean genetic resources. M Amurrio, M Santalla, A De Ron (Eds). PHASELIEU FAIR PL 97-3463: 79-94.
- Schmit V, Baudoin JP (1992) Screening for resistance to ascochyta blight in populations of *Phaseolus coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenman. Field Crop Res 30:155-165.
- Schwartz HF, Correa F, Pineda PA, Otoya MM, Kathermanl (1981) Dry bean yield losses caused by ascochyta, angular and white leaf spots in Colombia. Plant Dis 65:494-496.
- Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, Forster RL (2005) Compendium of Bean Diseases. 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

- Singh SP, Gutiérrez AJ, Molina A, Urrea C, Gepts P (1991). Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci* 31: 23-29.
- van Hintum THJL, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T (2000). Core collections of plant genetic resources. IPGRI Technical Bulletin N° 3. IPGRI, Rome, Italy.
- Voysest O (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 195 pp.