



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Genética

TESIS DOCTORAL

**Mejora de habas (*Vicia faba* L.) para
resistencia a *Botrytis fabae* Sard.**

Ángel M^a Villegas Fernández

Córdoba, 2012

TÍTULO: *Mejora de habas (Vicia faba L.) para resistencia a Botrytis fabae Sard.*

AUTOR: *Ángel M^a Villegas Fernández*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

TÍTULO DE LA TESIS:

Mejora de habas (*Vicia faba* L.) para resistencia a *Botrytis fabae* Sard.

DOCTORANDO/A:

Ángel M^a Villegas Fernández

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Que la presente tesis doctoral está concluida y es apta para su defensa. El trabajo ejecutado ha cubierto adecuadamente cada uno de los objetivos que se plantearon, respondiendo a diferentes cuestiones de la mejora genética vegetal, desde el ámbito más práctico y aplicado al ámbito más científico.

Fruto del trabajo de la presente tesis se han publicado ya 3 artículos en revistas científicas a nivel internacional y se están escribiendo 3 manuscritos más que se espera poder enviar en los próximos meses. Los artículos publicados son:

Villegas-Fernández, A.M., Sillero, J.C., Emeran, A.A., Winkler, J., Raffiot, B., Tay, J., Flores, F., Rubiales, D., 2009. Identification and multi-environment validation of resistance to *Botrytis fabae* in *Vicia faba*. *Field Crops Research* 114, 84-90.

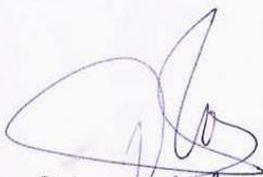
Villegas-Fernandez, A.M., Sillero, J.C., Erneran, A.A., Flores, F., Rubiales, D., 2011. Multiple-disease resistance in *Vicia faba*: Multi-environment field testing for identification of combined resistance to rust and chocolate spot. *Field Crops Research* 124, 59-65.

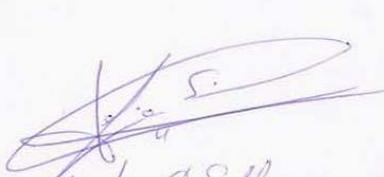
Villegas-Fernandez, A.M., Sillero, J.C., Rubiales, D., 2012. Screening faba bean for chocolate spot resistance: evaluation methods and effects of age of host tissue and temperature. *European Journal of Plant Pathology* 132, 443-453.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de junio de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: 
Diego Rubiales

Fdo.: 
Josepina C. Sillero

Fdo.: 
Carmen de Ariza



TÍTULO DE LA TESIS: Mejora de habas (*Vicia faba* L.) para resistencia a *Botrytis fabae* Sard.

DOCTORANDO/A: Ángel M^a Villegas Fernández

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca al programa de doctorado).

Como tutor y responsable de la línea de investigación 'Mejora Genética Vegetal' ratifico el informe presentado por los directores de la tesis.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de junio de 2012

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Juan Gil Ligeró

A Chiri

Agradecimientos

En cierta ocasión, hablando con alguien sobre este apartado de las tesis doctorales, comenté que además de los agradecimientos habría que incluir otra sección titulada “Desmerecimientos”. En realidad no es verdad, al menos no en mi caso. En todos estos (muchos) años que me ha llevado realizar la tesis sólo encuentro motivos para estar muy agradecido. Y si ha podido haber algo negativo, algún desencuentro, queda de sobra compensado por lo bueno que he recibido. Por eso deseo expresar mi profundo agradecimiento...

A Diego Rubiales, por haberme dado una primera oportunidad cuando la necesitaba, oportunidad renovada muchas veces en estos años, mostrando una confianza que a veces dudo merecer.

A Josefina Sillero, que ha estado en todo momento pendiente de mi trabajo, enseñándome, ayudándome y aconsejándome, y a la que he podido acudir siempre que lo he necesitado.

A Carmen Ávila, por haberme iniciado en un campo que tenía mucha ilusión por conocer, animándome en mi trabajo durante todo este tiempo con sobrada paciencia.

A ti, que ahora lees estas líneas. He compartido contigo muchas jornadas de trabajo, o puede que sólo unos pocos ratos. Me has ayudado, o quizás he sido yo quien te ha ayudado a ti. Has llevado con paciencia mis peticiones o mis preguntas. Me has acogido en tu laboratorio, o has sido visitante en el mío. Hemos reído o nos hemos desahogado juntos. Hemos vivido momentos importantes, o quizás intrascendentes y rutinarios. Eres mi amigo de años, o amigo reciente, o simplemente conocido. Hemos salido, viajado, comido, rezado juntos. Hemos ido de manifestación creyendo en un

futuro mejor para la investigación. Te has interesado por cómo iba la tesis, o has preferido ser prudente y respetar mis silencios. Estás junto a mí como siempre, o quizás nuestros caminos se separaron hace tiempo. Puede que ni siquiera leas esto, puede que yo sólo te venga de vez en cuando a la memoria. En cualquier caso, a ti, que posiblemente te alegrarás de que haya concluido este trabajo, muchas gracias. De corazón.

A mis padres, por haberme dado todo y ofrecerme una educación y una formación que me ha permitido llegar hasta aquí. A mi hermano, por haber alentado en mí la curiosidad y el afán por saber más.

A Chiri, por su inmensa paciencia y confianza en todos estos años. Por todo lo que ha tenido que aguantar, por todas las cosas que ha sacado adelante sola. No hubiese podido conseguirlo sin su apoyo.

A Él, que nunca dejó que me quebrase ni me apagase.

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la resistencia de las habas (*Vicia faba*) a la botritis, enfermedad causada por el hongo *Botrytis fabae*. Se ha partido desde lo más general en mejora vegetal hasta abordar aspectos más específicos de la respuesta a la enfermedad. Así, mediante ensayos de campo en múltiples ambientes se han identificado genotipos con niveles interesantes de estabilidad en la resistencia. Se ha desarrollado un método para evaluación de la enfermedad en condiciones controladas, lo que ha permitido estudiar el efecto de la temperatura y de la edad del tejido del huésped en la evolución de la misma. Igualmente, se ha puesto a punto un protocolo para la observación microscópica de la interacción planta – patógeno mediante microscopía confocal. Por otra parte, se han dado los primeros pasos para la mejora asistida por marcadores, con la obtención de un mapa genético a partir de la F₂ de un cruzamiento entre un genotipo resistente y otro susceptible. Sobre este mapa se ha localizado un QTL responsable del 40% de la resistencia. Asimismo se ha configurado el sistema *Medicago truncatula* / *Botrytis* spp. como modelo para *V. faba* / *Botrytis* spp., y se ha estudiado sobre dicho sistema modelo la influencia de la infección en la expresión de los factores de transcripción de la planta. Por último, se ha incrementado la calidad del material vegetal mediante la selección de genotipos resistentes no sólo a botritis, sino también a otra enfermedad de las habas, la roya.

Summary

In this work the resistance of faba bean (*Vicia faba*) to chocolate spot, a disease caused by the fungus *Botrytis fabae*, has been studied. It starts from generic plant breeding and reaches specific aspects of the response to the disease. Multi-environment field testing has allowed to identify genotypes possessing resistance with interesting levels of stability. A method for evaluating the disease under controlled conditions has been developed, which has permitted to assess the influence of temperature and the age of the host tissue on the evolution of the infection. Likewise a protocol has been optimised for the microscopic observation of the interaction plant – pathogen by means of confocal microscopy. On the other hand, the first steps towards marker-assisted breeding have been taken, and a genetic map of an F₂ cross between a resistant genotype and a susceptible one has been obtained. A QTL responsible for the 40% of the resistance has been located on that map. The system *Medicago truncatula* / *Botrytis* spp. has been established as a model for *V. faba* / *Botrytis* spp., and the influence of infection on the expression of the transcription factors of the plant has been studied on that model system. Finally, the quality of the plant material has been increased by selecting those genotypes which are resistant not only to chocolate spot, but also to another disease of faba bean, rust.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
¿Por qué mejorar para resistencia a enfermedades?	3
Las habas, un cultivo que contribuye a la seguridad alimentaria	7
La botritis	8
Estrategias para el control de la botritis	14
Prácticas agrícolas	
Control químico y biológico	
Empleo de resistencia genética	
Objetivos del presente trabajo	20
CAPÍTULO I	
Identificación y validación en múltiples ambientes de resistencia a <i>Botrytis fabae</i> en <i>Vicia faba</i>	29
Introducción	31
Objetivos	32
Material y métodos	32
Ensayos de campo	
Análisis estadístico	
Resultados	38
Comportamiento y estabilidad de los genotipos	
Evaluación de los ambientes	
Discusión	46
Bibliografía	52
CAPÍTULO II	
Métodos de evaluación de <i>Vicia faba</i> frente a <i>Botrytis fabae</i> e influencia de la edad del tejido del huésped y de la temperatura	57
Introducción	59
Objetivos	62
Material y métodos	62
Ensayos de campo	
Ensayo en hoja cortada	
Ensayo en planta completa	
Influencia de la edad de la planta y la temperatura	
Análisis estadístico	
Resultados	70
Ensayos de campo	
Ensayo en hoja cortada	
Ensayo en planta completa	
Comparación de los métodos de evaluación	
Influencia de la edad de la planta y de la temperatura	
Discusión	80
Comparación de los métodos de evaluación y selección de fuentes de resistencia	
Influencia de la edad de la hoja, de la planta y de la temperatura	
Bibliografía	88
CAPÍTULO III	
Caracterización a nivel microscópico de la resistencia de <i>Vicia faba</i> a <i>Botrytis fabae</i>	93
Introducción	95
Objetivos	97

Material y métodos	97
Caracterización histológica de la infección	
Estudio de la germinación de <i>B. fabae</i>	
Análisis estadístico	
Resultados	103
Caracterización histológica de la infección	
Estudio de la germinación de <i>B. fabae</i>	
Discusión.....	108
Bibliografía	114

CAPÍTULO IV

Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a *Botrytis fabae* en *Vicia*

<i>faba</i>	117
Introducción	119
Objetivos	121
Material y métodos	121
Construcción del mapa de ligamiento	
Evaluación de la respuesta a <i>B. fabae</i>	
Identificación de QTLs de resistencia a <i>B. fabae</i>	
Resultados	126
Construcción del mapa de ligamiento	
Evaluación de la respuesta a <i>B. fabae</i>	
Identificación de QTLs de resistencia a <i>B. fabae</i>	
Discusión	132
Bibliografía	137

CAPÍTULO V

Caracterización de la interacción *Medicago truncatula* / *Botrytis* spp. mediante el estudio de expresión de factores de transcripción

.....	141
Introducción	143
Objetivos	145
Material y métodos	145
Evaluación de los genotipos de <i>Medicago truncatula</i>	
Estudio del perfil de expresión génica de los factores de transcripción	
Resultados	151
Evaluación de los genotipos de <i>Medicago truncatula</i>	
Estudio del perfil de expresión génica de los factores de transcripción	
Discusión	156
Bibliografía	171

CAPÍTULO VI

Resistencia múltiple en *Vicia faba* a botritis (*Botrytis fabae*) y roya (*Uromyces viciae-fabae*): identificación mediante ensayos en múltiples ambientes

.....	175
Introducción	177
Objetivos	179
Material y métodos	179
Ensayos de campo	
Ensayos en planta completa en condiciones controladas	
Análisis estadístico	

Resultados	184
Ensayos de campo	
Ensayos en planta completa en condiciones controladas	
Discusión	193
Bibliografía	198
DISCUSIÓN GENERAL	201
CONCLUSIONES	207
BIBLIOGRAFÍA	213

Introducción general

¿Por qué mejorar para resistencia a enfermedades?

El deber de publicar los informes de las investigaciones llevadas a cabo sobre las personas que “han muerto de hambre” se ha vuelto ahora tan frecuente, y son tales los números que nos llegan a diario de todas las partes del país, que los límites de espacio no permiten su publicación. Nuestro reportero envía detalles de 15 tales casos en Bantry ayer, y menciona que 20 más han ocurrido durante la semana, aunque no se han podido investigar; y recibimos esta mañana desde Mallow el informe de 11 investigaciones llevadas a cabo por el señor Richard Jones sobre personas que habían muerto por falta de comida. Las noticias afluyen desde todos los distritos, no tenemos espacio ni para la décima parte de ellas, todas relatando similares hechos horribles.

Estas palabras son parte de un artículo escrito el 10 de febrero de 1846 por el corresponsal en Dublín del periódico británico *The Times* (Anónimo, 1846), relatando los efectos de la gran hambruna (*The Great Famine*) de Irlanda de mediados del siglo XIX. La cosecha de patata, vital en un país dependiente de este cultivo, se vio devastada durante varios años por el hongo patógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, lo que conllevó consecuencias desastrosas para la sociedad irlandesa: en un país de aproximadamente ocho millones y medio de habitantes se redujo la población en dos millones en apenas seis años, calculándose que un millón de personas perecieron y que otro millón hubo de emigrar.

En nuestra actual sociedad occidental en la que el abastecimiento de alimentos parece infaliblemente garantizado, la necesidad de investigar y desarrollar estrategias para controlar las enfermedades de los cultivos puede resultar algo de limitado interés, ajeno a las necesidades de la mayoría. Sin embargo, las enfermedades de las plantas cultivadas han estado presentes desde siempre en la historia de la agricultura, poniendo en peligro los rendimientos y ocasionando serios problemas en muchas regiones del planeta, también hoy en

día. Es cierto que los avances tecnológicos han supuesto que el riesgo de epidemias con graves consecuencias sea mucho menor en los países desarrollados que en el resto del mundo, pero no se ha de perder de vista que cambios inesperados, como la aparición de un patógeno desconocido o las alteraciones ambientales, pueden dar al traste con la frágil estabilidad de los sistemas agrícolas (Vurro et al., 2010).

La “seguridad alimentaria” se define como la existencia en todo momento de acceso físico y económico a alimentación suficiente, segura y nutritiva, que cubra las necesidades de dieta y las preferencias alimenticias para una vida saludable y activa (Ruane y Sonnino, 2011). Es una realidad que una parte importante de la población mundial carece de seguridad alimentaria, estimándose que cerca de mil millones de personas padecen hambre (FAO-Hambre, 2008). La solución a esta tragedia es compleja y requiere diferentes estrategias que escapan al objeto de este trabajo, sin embargo, una medida obvia y prioritaria es aumentar la producción de alimentos. Para esto, es preciso tener en cuenta el papel de las enfermedades de las plantas, ya que se estima que la pérdida en el rendimiento de las cosechas a nivel mundial debido a las mismas es del 10-16% (Strange y Scott, 2005; Oerke, 2006), lo que supone que en un gran número de casos las pérdidas serán mucho mayores, especialmente en los países menos desarrollados. La pobreza agrava los efectos de los bajos rendimientos, y es justamente en las zonas más desfavorecidas donde no es admisible que se pierda tanto de lo que potencialmente podría producirse (Flood, 2010).

La agricultura se ve afectada por el cambio climático, aunque sea difícil predecir de qué modo. El número de variables involucradas a tener en cuenta es muy elevado, con múltiples interacciones entre unas y otras, de manera que las hipótesis que se formulen tendrán siempre una fiabilidad limitada. En lo que se refiere a la repercusión del cambio climático sobre las relaciones planta/patógeno, son también numerosos los factores a tener en

cuenta (Garrett et al., 2006; Chakraborty y Newton, 2011), por ejemplo: la modificación de la arquitectura de la planta (que puede ser provocada por el mayor nivel de CO₂), lo que puede alterar las condiciones ambientales en su entorno inmediato; el aumento de la densidad vegetal, lo que supone un incremento de la humedad en las hojas; o, por supuesto, el modo en que las nuevas condiciones de temperatura y humedad puedan afectar a la biología de los patógenos. También es de interés el efecto que la alteración estacional del clima puede tener en la sincronía entre la fenología del cultivo y los patrones de desarrollo de los patógenos, de modo que se pueden dar casos de escapes o coincidencias no previstos (Juroszek y von Tiedemann, 2011). Otra cuestión a tener en cuenta es el posible cambio en la distribución geográfica de los patógenos, de modo que éstos aparezcan en zonas en las que no eran previamente conocidos (Shaw y Osborne, 2011).

Una aproximación interesante a esto es considerar la repercusión que el cambio climático tiene sobre las diferentes estrategias de lucha contra las enfermedades. Tomemos el caso del control químico: es sabido que los productos fitosanitarios se ven muy influidos por las condiciones ambientales, por lo que el cambio climático puede tener efectos positivos o negativos en su eficacia (Juroszek y von Tiedemann, 2011). En cuanto al empleo de variedades resistentes, nuevamente son múltiples los elementos que pueden condicionar su eficacia. Así, estreses debidos a altas temperaturas o sequía pueden disminuir la resistencia de una planta debido al debilitamiento de la misma; pero igualmente puede suceder lo contrario, que la situación de estrés induzca rutas generales de defensa que incrementen la resistencia (Garrett et al., 2006). Asimismo habría que valorar los efectos de otros factores: hay genes de resistencia que se ven influidos por el aumento de temperatura, algunos inhibiéndose (Wang et al., 2009) y otros estimulándose (Fondevilla et al., 2006); también el CO₂ o el ozono pueden modificar las respuestas de resistencia (Plessl et al., 2005; Eastburn et al., 2011). Otro aspecto a tener en cuenta es que las modificaciones en los ciclos de vida de los patógenos y en los ecosistemas en que se encuentran

debido a las alteraciones ambientales pueden acelerar los procesos evolutivos que les permitan superar en menos tiempo las resistencias que encuentren en sus huéspedes (Garrett et al., 2006; Juroszek y von Tiedemann, 2011).

Hemos visto, pues, que las enfermedades de las plantas constituyen un riesgo para la seguridad alimentaria mayor del que pueda parecer en una primera consideración. Lo es ya de hecho en las regiones más empobrecidas del planeta, e incluso en nuestro próspero primer mundo no es descartable que surjan desafíos imprevistos que puedan desequilibrar sistemas agrícolas enteros. A la inestabilidad propia de las interacciones planta/patógeno en los ecosistemas actuales se unen los efectos imprevisibles que el cambio climático puede tener sobre los mismos, lo que aumenta el grado de inseguridad sobre la capacidad que tenemos de controlar los patógenos vegetales.

Una vez asumida esta situación, el siguiente paso es poner en marcha un conjunto de estrategias para prevenir situaciones graves, y solucionarlas lo más eficazmente posible cuando que se presenten. No podemos recoger en este corto espacio todas las posibles opciones, pero sí queríamos centrarnos en una cuestión. Más allá de las diversas medidas de higiene preventiva que se puedan establecer, o las prácticas agrícolas que reduzcan el riesgo y la incidencia de las enfermedades, a la hora de la verdad, en el momento en que el patógeno está presente en el cultivo, las principales alternativas para su control son dos: el uso de productos químicos fitosanitarios, o el empleo de variedades resistentes al mismo (el control biológico es prometedor y puede reducir el impacto y el uso de los productos químicos, pero en la actualidad no puede proponerse todavía como una solución a nivel global). Los agroquímicos, en general, son costosos para el agricultor, y también para el medio ambiente: se considera que a pesar del aumento de rendimiento que suele conllevar su uso, a la larga acarrear importantes daños medioambientales, e incluso pueden deteriorar la calidad de los productos alimenticios (Carvalho, 2006). El uso de variedades resistentes, por el contrario, resulta más favorable en términos medioambientales, y es más

adecuado con vistas al establecimiento de una agricultura sostenible (Pretty, 2008). La mejora vegetal por resistencia a enfermedades es, por tanto, una herramienta clave para el control de las amenazas provenientes de los patógenos vegetales, pudiendo resultar decisiva para una mayor seguridad alimentaria.

Las habas, un cultivo que contribuye a la seguridad alimentaria

Las leguminosas son de gran importancia para el ser humano. Han estado presentes en la mayoría de las civilizaciones desde que comenzó el desarrollo de la agricultura (Graham y Vance, 2003). Se emplean para alimentación humana y animal, en este último caso tanto para pienso como para pasto, destacando el alto contenido proteico de sus semillas: aportan un tercio de las necesidades de proteínas del ser humano, pudiendo llegar hasta el 50% en condiciones de subsistencia (Graham y Vance, 2003). Se las considera también la fuente de proteína más barata y accesible para los pobres (Tharanathan y Mahadevamma, 2003). Son igualmente de gran relevancia por su capacidad de fijar nitrógeno, lo que resulta capital para el mantenimiento de los suelos agrícolas. A pesar de esto, las leguminosas son un cultivo secundario frente a los grandes cereales (arroz, trigo y maíz), en parte debido a su mayor sensibilidad a los estreses bióticos y abióticos y a sus menores rendimientos (Siddique et al., 2012).

Las habas (*Vicia faba* L.) son unas de las leguminosas más cultivadas, de gran valor nutritivo y ampliamente utilizada tanto para consumo humano como pienso para animales (Crepon et al., 2010). Según las cifras de la FAO, en 2010 ocuparon una superficie de cultivo de 2.559.773 hectáreas, y alcanzaron el sexto lugar en producción entre las leguminosas, con 4.312.871 toneladas (FAOSTAT, 2010). Los principales productores son China, Europa (principalmente Reino Unido, Francia, España, Portugal y Grecia), Etiopía, Egipto y Australia (Duc et al., 2010). Se cultivan en diferentes climas,

pudiéndose definir tres amplios grupos: mediterráneas, de invierno y de primavera. Requieren temperaturas moderadas, por lo que las mediterráneas y de invierno se siembran en otoño en climas templados y subtropicales, mientras que las que se siembran en primavera son propias de latitudes más altas (Duc, 1997; Stoddard et al., 2010). Se distinguen cuatro subespecies en las habas: *paucijuga*, *major*, *minor* y *equina* (Cubero, 1974). Son parcialmente alógamas, habiéndose estimado el porcentaje medio de alogamia en torno al 30-40%, requiriendo para la fecundación cruzada la polinización mediante insectos, fundamentalmente abejas (Susó et al., 2001).

Las habas son un cultivo de elevado interés para el desarrollo de una agricultura sostenible (Rubiales, 2010), y pueden contribuir en gran medida a la seguridad alimentaria en muchas regiones del mundo, tanto por su consumo directo como por su uso como pienso para ganado. Sin embargo, las habas se encuentran sometidas a múltiples estreses bióticos: enfermedades fúngicas de la parte aérea, entre las que destacan las ocasionadas por *Botrytis* spp., *Ascochyta fabae* Speg., *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Shört. o *Cercospora zonata* G. Winter; hongos de suelo que atacan la raíz, fundamentalmente *Fusarium* spp.; plantas parásitas, sobre todo *Orobanche crenata* Forsk. y *Orobanche foetida* Poir; varios tipos de nematodos, principalmente del tallo (*Ditylenchus* spp.) y numerosos virus (Stoddard et al., 2010). Estos estreses comprometen seriamente los rendimientos en muchos casos, limitando así las potencialidades del cultivo de las habas.

La botritis

La botritis es una enfermedad fúngica que afecta a los cultivos de habas en muchas partes del mundo, especialmente en las regiones húmedas. Sus síntomas característicos son pequeñas lesiones circulares de crecimiento limitado y color marrón oscuro (Figura 1) que le han dado el nombre característico con el que es conocida en inglés: *chocolate spot* (mancha de

Figura 1. Lesiones de botritis en hojas de habas. Las flechas señalan lesiones agresivas en desarrollo, más extendidas en (A) que en (B).



chocolate). Estos síntomas se encuentran con frecuencia en las hojas y los tallos de *Vicia faba*, sin que supongan una seria amenaza para la misma. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables para el desarrollo de la enfermedad (temperaturas moderadas y alta humedad relativa) pueden

aparecer las llamadas “lesiones agresivas”. Éstas consisten en necrosis rápidas y extendidas que no provienen del crecimiento y unión de las lesiones circulares sino que se deben a un colapso generalizado del tejido vegetal en una zona concreta (Figura 1); en ocasiones, las lesiones pueden incluso llegar a afectar a las vainas (Figura 2). Cuando varios ciclos de infección tienen lugar en un corto espacio de tiempo, las necrosis se expanden con rapidez y pueden llevar a la defoliación y la muerte de toda la planta. Estos efectos devastadores hacen de esta enfermedad una de las causas más importantes de disminución de rendimientos en las habas. Se han registrado pérdidas de hasta el 90% en Australia, del 61% en Etiopía, del 59% en el Reino Unido y de más del 50% en China (Davidson et al., 2007).

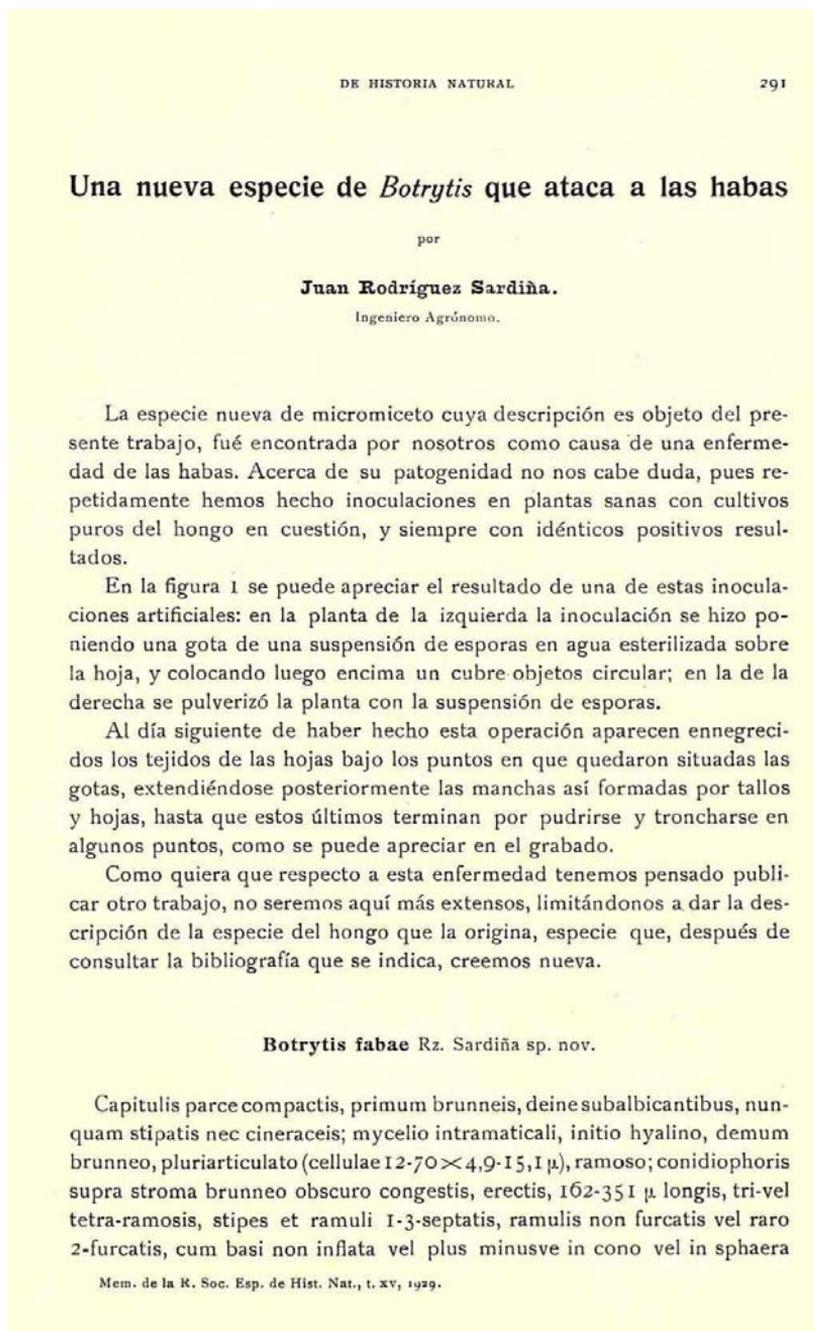
Figura 2. Vainas dañadas por botritis: el daño llega a afectar incluso a las semillas, que muestran una coloración rojiza.



Los hongos necrotrofos *Botrytis cinerea* Pers. Fr. y *Botrytis fabae* Sard. han sido considerados tradicionalmente los agentes responsables de esta enfermedad, siendo frecuente aislarlos conjuntamente a partir de tejido con síntomas de la misma. *B. fabae* es el más importante con diferencia, ya que es el causante de los daños de consideración en los cultivos, mientras que las lesiones debidas a *B. cinerea* rara vez se convierten en agresivas. *B. cinerea* es un patógeno de amplio espectro que infecta más de 200 especies, fundamentalmente dicotiledóneas (Williamson et al., 2007). *B. fabae*, en cambio, es un patógeno especializado, que infecta principalmente a *Vicia faba* y otras especies del género *Vicia*, aunque también puede darse en algunas otras especies de leguminosas pertenecientes a los géneros *Lens*, *Pisum* y *Phaseolus* (Staats et al., 2005). Fue Rodríguez Sardiña (1929) quien, además de describir *B. fabae* como una nueva especie, lo caracterizó como patógeno de las habas (Figura 3).

Harrison (1988) realizó una extensa revisión sobre la biología de *B. fabae* y *B. cinerea* como patógenos de las habas, revisión que seguiremos para realizar una descripción general del desarrollo de la enfermedad. Las esporas (o conidias) de estos hongos se dispersan por el viento hasta que se establecen en la parte aérea de las plantas de habas, fundamentalmente sobre las hojas. La lluvia también puede contribuir a la dispersión de las esporas, aunque en este caso se desplazan a distancias más cortas, dentro del mismo campo de cultivo. Una vez que se han fijado sobre el tejido vegetal, las esporas germinan, se desarrolla un tubo germinativo de longitud variable y se produce la penetración. La penetración tiene lugar directamente a través de las células epidérmicas, y las hifas crecen intercelularmente en el interior del mesófilo, provocando la muerte de las células vegetales para así nutrirse de ellas. En experimentos en condiciones controladas se ha comprobado que este proceso tarda en comenzar apenas 6 horas tras la inoculación. La esporulación se produce sobre el mismo tejido necrótico de la planta, en unas estructuras denominadas conidióforos, y desde ahí se inicia otro ciclo de infección. Las condiciones adecuadas tanto para

Figura 3. Primera página del artículo de Rodríguez Sardiña en las *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural* (1929) en el que describió por primera vez *Botrytis fabae* y la identificó como patógeno de las habas.



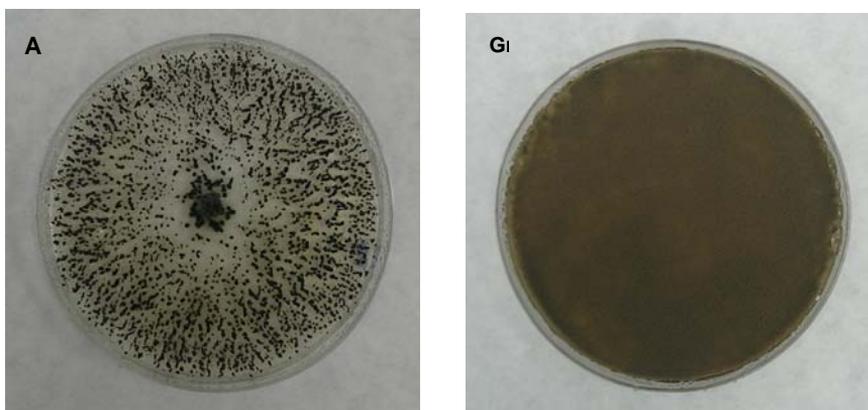
la germinación de las esporas, la expansión de las lesiones y la esporulación son temperaturas en torno a los 20 °C y humedades relativas superiores al 90%, mejor cuanto más cercanas a la saturación (salvo en el caso de la esporulación, en que el óptimo parece alcanzarse con una humedad justo por debajo del 100%). Cuando las condiciones ambientales no les son favorables, estos hongos pueden sobrevivir en forma de unas estructuras llamadas esclerocios, tanto en el suelo como en los restos de cosecha, a partir de los cuales se desarrollarán una vez que el ambiente sea propicio.

Aunque los esclerocios normalmente cuando germinan producen micelio o esporas, en determinadas condiciones pueden dar lugar a apotecios, que conforman el estado sexual de *Botrytis*, el teleomorfo *Botryotinia*, y que contienen las ascosporas resultantes de la meiosis. El teleomorfo de *B. cinerea* es *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzelm, y el de *B. fabae* es *Botryotinia fabae* J.Y. Lu & T.H. Wu.

Es prácticamente imposible distinguir *B. fabae* de *B. cinerea* en las habas, ya que los síntomas son muy similares (salvo cuando se desarrollan lesiones agresivas) y morfológicamente ambos hongos no son fáciles de diferenciar. En medios de cultivo también crecen de modo muy similar, aunque existen criterios para su clasificación, como el tamaño y número de los esclerocios o el tamaño de las esporas. Este último es uno de los más fiables y relativamente sencillos de aplicar: las esporas de *B. cinerea* son más pequeñas que las de *B. fabae*, midiendo unos 9-12 μm x 7-10 μm las primeras, frente a unos 15-24 μm x 11-18 μm las segundas (Davidson et al., 2007). En cualquier caso, como hemos dicho más arriba, consideramos a *B. fabae* el principal causante de la botritis y de los daños de importancia para las habas. En la Figura 4 se presentan dos aislados de *B. fabae* crecidos en medio PDA (patata, dextrosa, agar): en el primero se pueden observar los esclerocios, que tienen un distintivo color negro, debido a que su corteza externa está constituida por

células que contienen melanina; en el segundo se observa micelio en esporulación.

Figura 4. Aislados de *B. fabae* crecidos en medio PDA (patata, dextrosa, agar) en placas Petri de 9 cm de diámetro, mostrando distintos hábitos de crecimiento: en (A) se observan los esclerocios, con su distintivo color negro y en (B) se presenta micelio en esporulación.



Recientemente se ha descrito en China una nueva especie, *Botrytis fabiopsis* Zhang, Wu & Li, como causante también de botritis en habas, en principio con agresividad similar a *B. fabae* (Zhang et al., 2010). Se requerirán más estudios para conocer mejor el comportamiento de esta especie, y determinar si está presente en otras regiones aunque no haya sido detectada hasta la fecha.

Estrategias para el control de la botritis

El control de las enfermedades de las plantas, encaminado tanto a la prevención de la enfermedad como a la erradicación del patógeno una vez que ha aparecido, se suele organizar en torno a tres grandes ejes: el manejo del

cultivo, es decir, el conjunto de las diferentes prácticas agrícolas; la eliminación del patógeno mediante el uso de productos químicos o mediante control biológico; y el uso de material vegetal resistente a la enfermedad. Describimos brevemente estas estrategias para el caso de la botritis.

Prácticas agrícolas

Las prácticas para el control de la botritis están fundamentalmente encaminadas a tres objetivos:

Reducir la exposición del cultivo al patógeno

Sólo se deberían cultivar habas en el mismo campo cada cuatro años, de modo que se evitase el inóculo que se encuentra presente en los restos vegetales (Bretag et al., 2010); esta rotación debería hacerse excluyendo otras plantas huésped, como lenteja. Si no es posible la rotación, suele resultar de utilidad el enterrar los restos de cultivo profundamente. Se recomienda asimismo no sembrar cerca de rastrojos de plantaciones de habas ni de otros cultivos huéspedes de la temporada anterior (Anónimo, 2006).

Hacer que las plantas sean menos susceptibles a la infección

Cualquier factor que disminuya el vigor de las plantas favorece el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, se deberían evitar las deficiencias de nutrientes como el fósforo o el potasio, así como elevada infestación de malas hierbas; igualmente, se debe evitar el encharcamiento mediante el adecuado drenaje del suelo (Anónimo, 2006). El daño por heladas también aumenta la susceptibilidad a botritis (Harrison, 1988), así que se debe escoger una fecha de siembra adecuada: normalmente, las siembras tempranas no son convenientes.

Modificar las condiciones ambientales en el entorno inmediato de la planta de modo que sea menos adecuado para el establecimiento y el progreso de la enfermedad

La reducción de la humedad relativa en el entorno de la planta es un modo eficaz de obstaculizar el proceso de infección. Es crucial para esto favorecer la aireación del cultivo, lo que se puede conseguir disminuyendo la dosis de siembra (disminuyendo a su vez la densidad de plantas) y manteniendo el campo libre de malas hierbas.

Se ha propuesto la siembra intercalar (*intercropping* en inglés) de *V. faba* con cereales como un método para reducir la incidencia de la botritis. Algunos estudios recientes presentan resultados prometedores (Sahile et al., 2008; Fernandez-Aparicio et al., 2011). Con esta práctica se buscan dos de los objetivos expuestos más arriba: por un lado, el cereal funciona como barrera frente a la extensión del inóculo; por otro, también favorece la aireación y se disminuye la densidad de las plantas de habas.

Control químico y biológico

Por el momento, los fungicidas son una herramienta irremplazable a la hora de controlar brotes importantes de botritis. Se emplean frecuentemente en muchos campos de cultivo en todo el mundo, y su eficacia ha sido el objeto de diferentes estudios (Bainbridge et al., 1985; Mohamed et al., 1996; Sahile et al., 2008). Sin embargo, presentan algunas desventajas importantes, principalmente el alto coste y las repercusiones medioambientales. Por tanto, su uso debería circunscribirse a aquellas situaciones en las que fuesen imprescindibles, y siempre en combinación con otras medidas del tipo de las aquí comentadas. Los elementos clave a la hora de tratar con fungicidas son la elección de la materia activa y el tiempo de aplicación.

Existe un amplio espectro de compuestos que han sido descritos como útiles a la hora de controlar la botritis: bencimidazoles (benomilo, carbendazima), dicarboximidias (procimidona, iprodiona, vinclozolina), ditiocarbamatos (mancozeb), aromáticos (clortalonil), conazoles (tebuconazol, ciproconazol, metconazol) o estrobilurinas (azoxistrobina, pyraclostrobin). Aunque algunas moléculas pueden tener efectos curativos (iprodiona, vinclozolina, tebuconazol) (Anónimo, 2011), se acepta como principio general que los tratamientos han de hacerse con un criterio preventivo, es decir, para impedir que la enfermedad progrese una vez que ha comenzado. El posible desarrollo de resistencias por parte del patógeno es uno de los criterios más importantes a considerar a la hora de elegir el fungicida adecuado para cada situación. Ya se conocen resistencias para algunos productos, como en el caso de los bencimidazoles y las dicarboximidias (Anónimo, 2009). Para evitarlas, se deben realizar mezclas de materias activas pertenecientes a diferentes grupos, así como alternarlas en los tratamientos; finalmente, sólo se deben emplear las dosis correctas.

En cuanto al tiempo de aplicación, la floración es el mejor momento para comenzar, y no suele ser necesario hacerlo antes. En cualquier caso, parece razonable que se trate sólo si se dan algunos requisitos previos. La fecha de la primera aplicación y de las siguientes dependerá de la experiencia previa que se tenga en la zona de cultivo. Las condiciones ambientales son decisivas para el desarrollo de la botritis, así que las predicciones meteorológicas se han de tener muy en cuenta a la hora de planificar los tratamientos. Se debería adoptar un esquema de toma de decisiones que incluyese al menos los síntomas observados en el campo, el pronóstico meteorológico y el rendimiento potencial del cultivo (MacLeod y Galloway, 2002). Hay que resaltar que el número de tratamientos debe ser el mínimo posible para garantizar el control de la enfermedad y la recuperación de la inversión, de modo que se garantice la eficiencia medioambiental y económica.

Se han investigado posibles alternativas a los fungicidas tradicionales más favorables para el medioambiente. Se ha encontrado que el aceite esencial de la albahaca (*Ocimum basilicum*) posee propiedades antifúngicas contra *B. fabae* tanto *in vitro* como *in vivo* en plantas infectadas (Oxenham et al., 2005). El control biológico puede ser también una opción en el futuro. De momento, los estudios con algunos microorganismos antagonistas del patógeno han mostrado resultados prometedores (Jackson et al., 1997; Sharga, 1997). Sin embargo, no se debe olvidar que desde el laboratorio al campo hay un largo recorrido, y sucede a menudo que aquello que funciona bien en los experimentos en condiciones controladas termina fracasando en la agricultura real.

Empleo de resistencia genética

Se considera que el cultivo de variedades con resistencia genética es fundamental a la hora de minimizar el daño por botritis, ya que las prácticas agrícolas recomendadas no son siempre suficientemente efectivas, y el empleo de fungicidas suele ser demasiado costoso (en términos tanto económicos como medioambientales). La disponibilidad de buenas fuentes de resistencia es el factor limitante a la hora de desarrollar cultivares resistentes a botritis. Aunque se ha encontrado alta resistencia en algunas especies del género *Vicia* (por ejemplo, *Vicia narbonensis*), no es posible su uso ya que no puede cruzarse *V. faba* con ninguna de ellas (Harrison, 1988). Por lo tanto, la única opción es evaluar las colecciones de germoplasma para resistencia. En los últimos años se ha llevado a cabo un importante esfuerzo de investigación encaminado a encontrar fuentes de resistencia y a mejorar los métodos de evaluación de la misma (Hanounik y Robertson, 1988; Rhaïem et al., 2002; Bouhassan et al., 2003; Bouhassan et al., 2004). El ICARDA (*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*) ha promovido programas en diversos países para incorporar resistencias en sus cultivares locales, lo que ha dado lugar a la introducción de algunas variedades en lugares como Australia, Egipto

o Etiopía. Hasta el momento no se ha encontrado resistencia completa, de modo que se está usando resistencia parcial. Si este tipo de resistencia tiene una base multigénica, como podría suponerse, podría ser de gran utilidad, ya que su superación por parte de nuevas razas del patógeno sería más difícil. En cualquier caso, se requieren más esfuerzos para descubrir nuevas fuentes de resistencia. Es significativo que la mayor parte del material resistente encontrado proviene de las regiones andinas de Colombia y Ecuador (Tivoli et al., 2006).

Una vez que se han conseguido fuentes de resistencia, la siguiente fase consistiría en el desarrollo de un programa de cruzamientos que permitiese la incorporación de la resistencia en material de interés agrícola. La integración de resistencias provenientes de diferentes fuentes resultaría apropiada. También sería útil el disponer de algunos marcadores que ayudasen a la selección de este proceso: la síntesis del ácido wyerónico (fitoalexina propia de *V. faba*) y la medida de la actividad peroxidasa se han propuesto como marcadores de resistencia (Nawar y Kuti, 2003). Igualmente, la obtención de marcadores moleculares, como ya se ha hecho en los casos de otras enfermedades de habas (Torres et al., 2010) podría facilitar el trabajo de mejora.

Investigaciones recientes sobre resistencia inducida apuntan a que algunos compuestos químicos podrían ejercer un efecto positivo en la resistencia de plantas infectadas con *B. fabae*. Entre estos compuestos se ha descrito que son efectivos los ácidos salicílico, benzoico y oxálicos, y la ribavirina (Hassan et al., 2006). Dado que actúan como inductores, se ha sugerido que podrían intervenir en el desarrollo de tratamientos preventivos. Por último, también se ha propuesto la inducción de resistencia mediante la doble inoculación con *Rhizobium leguminosarum* y micorrizas (Rabie, 1998). En cualquier caso todavía es pronto para saber si alguna de estas estrategias logrará llegar hasta el mercado agrícola.

Objetivos del presente trabajo

En las páginas previas hemos expuesto el desafío que los patógenos vegetales suponen para la agricultura y, por ende, para las sociedades en su conjunto, comprometiendo la seguridad alimentaria, especialmente en aquellas regiones menos desarrolladas o empobrecidas. Hemos indicado que la mejora vegetal para resistencia a enfermedades es una de las herramientas más adecuadas para hacer frente a dicho desafío. Hemos señalado la importancia de las leguminosas en general y de las habas en particular a la hora de procurar alimento en el contexto de una agricultura sostenible. Y, finalmente, hemos identificado a la botritis como una de las enfermedades más importantes que amenazan los cultivos de habas en la mayoría de las regiones en que se cultivan.

Nuestro reto, por tanto, es ofrecer desde la mejora vegetal soluciones sostenibles que permitan reducir la merma de la producción de los cultivos de habas ocasionada por botritis, con la intención de aportar una pequeña contribución a la mejora de la seguridad alimentaria en el mundo.

Con este planteamiento hemos elaborado un proyecto que intenta cubrir diferentes aspectos de esta cuestión. En primer lugar, es preciso identificar nuevas fuentes de resistencia válidas en condiciones de cultivo a partir de las que poder desarrollar el trabajo posterior y, en un futuro, obtener variedades cultivadas resistentes a botritis; se debe también caracterizar la respuesta a la enfermedad, tanto a nivel macroscópico como microscópico, por lo que es necesario disponer de métodos adecuados y fiables para ello; por último, consideramos de gran interés la descripción de la resistencia a escala molecular, identificando los genes responsables de la misma y comprendiendo su funcionamiento y regulación. Nuestra aproximación, pues, no es unidireccional, sino que se realiza desde distintos frentes, con la intención de

aprovechar el conocimiento acumulado a partir de múltiples disciplinas y técnicas en el campo de la mejora por resistencia a enfermedades.

Considerando todo esto, hemos estructurado nuestro proyecto en torno a seis grandes objetivos, que son:

- Identificar en campo nuevas fuentes de resistencia a *B. fabae* en habas, fuentes que sean estables en diferentes ambientes y a lo largo del tiempo.
- Poner a punto métodos de estudio de la interacción *V. faba* / *B. fabae* en condiciones controladas, de modo que nos faciliten, por un lado, la identificación de material vegetal resistente a la enfermedad y, por otro, el estudio de los diferentes factores que pueden afectar a dicha interacción.
- Poner a punto un método para el estudio de la interacción *V. faba* / *B. fabae* a nivel microscópico, de modo que nos permita caracterizar las diferentes respuestas de la planta al patógeno.
- Establecer las bases para la identificación de los genes responsables de la resistencia y para la mejora asistida por marcadores mediante la elaboración de un mapa genético de un cruzamiento de interés y la identificación de marcadores moleculares asociados a la resistencia.
- Desarrollar el sistema patogénico *Medicago truncatula* / *Botrytis* spp. como modelo para el sistema *V. faba* / *Botrytis* spp., y caracterizar en dicho modelo la respuesta a los patógenos mediante el estudio de expresión de factores de transcripción.
- Incrementar la calidad del material obtenido, seleccionando aquellos genotipos que presenten resistencia estable no sólo a botritis sino también a otro importante estrés biótico como es la roya de las habas.

Bibliografía

- Anónimo, 1846. The Distress. The Times, London.
- Anónimo, 2006. Fungal and bacterial diseases of faba bean. Government of Australia - Department of Agriculture and Food.
http://www.agric.wa.gov.au/PC_92106.html?s=0
- Anónimo, 2009. Fungicide resistance. Fungicide Resistance Action Group-UK
http://www.pesticides.gov.uk/Resources/CRD/Migrated-Resources/Documents/F/FRAG_UK_General_leafletv5_1a_Jan_09.pdf
- Anónimo, 2011. Winter beans - Diseases - Fungicide choice. Werry & Sons Ltd.
<http://www.winter-beans.co.uk/all-about-winter-beans/disease/fungicide-choice>
- Bainbridge, A., Fitt, B.D.L., Creighton, N.F., Cayley, G.R., 1985. Use of fungicides to control chocolate spot (*Botrytis fabae*) on winter field beans (*Vicia faba*). Plant Pathology 34, 5-10.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Khiati, N.E., 2003. Analysis by detached leaf assay of components of partial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard. Phytopathologia Mediterranea 42, 183-190.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Portapuglia, A., 2004. Influence of growth stage and leaf age on expression of the components or partial resistance of faba bean to *Botrytis fabae* Sard. Phytopathologia Mediterranea 43, 318-324.
- Bretag, T., Raynes, M., Richardson, H., Henry, F., 2010. Chocolate spot of faba bean. Agriculture Notes. State of Victoria, Department of Primary Industries.
<http://www.dpi.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/plant-diseases/grains-cereals/ag0153chocolate-spot-of-faba-bean>
- Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. Environmental Science & Policy 9, 685-692.

- Crepon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouee, B., Arese, P., Duc, G., 2010. Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research* 115, 329-339.
- Cubero, J.I., 1974. Evolution of *Vicia faba* L. *Theoretical and Applied Genetics* 45, 47-51.
- Chakraborty, S., Newton, A.C., 2011. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60, 2-14.
- Davidson, J., Pande, S., Bretag, T., Lindbeck, K., Krishna-Kishore, G., 2007. Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, pp. 295-318.
- Duc, G., 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* 53, 99-109.
- Duc, G., Bao, S., Baum, M., Redden, B., Sadiki, M., Jose Suso, M., Vishniakova, M., Zong, X., 2010. Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Research* 115, 270-278.
- Eastburn, D.M., McElrone, A.J., Bilgin, D.D., 2011. Influence of atmospheric and climatic change on plant-pathogen interactions. *Plant Pathology* 60, 54-69.
- FAO-Hambre, 2008. <http://www.fao.org/hunger/hunger-home/es/>
- FAOSTAT, 2010. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- Fernandez-Aparicio, M., Shtaya, M.J.Y., Emeran, A.A., Allagui, M.B., Kharrat, M., Rubiales, D., 2011. Effects of crop mixtures on chocolate spot development on faba bean grown in mediterranean climates. *Crop Protection* 30, 1015-1023.
- Flood, J., 2010. The importance of plant health to food security. *Food Security* 2, 215-231.
- Fondevilla, S., Carver, T.L.W., Moreno, M.T., Rubiales, D., 2006. Macroscopic and histological characterisation of genes *er1* and *er2* for powdery mildew resistance in pea. *European Journal of Plant Pathology* 115, 309-321.

- Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N., Travers, S.E., 2006. Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. Annual review of phytopathology 44, 489-509.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiology 131, 872-877.
- Hanounik, S.B., Robertson, L.D., 1988. New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. Plant Disease 72, 696-698.
- Harrison, J.G., 1988. The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease - a review. Plant Pathology 37, 168-201.
- Hassan, M.E.M., Abd El-Rahman, S.S., El-Abbasi, I.H., Mikhail, M.S., 2006. Inducing resistance against faba bean chocolate spot disease. Egyptian Journal of Phytopathology 34, 69-79.
- Jackson, A.J., Walters, D.R., Marshall, G., 1997. Antagonistic interactions between the foliar pathogen *Botrytis fabae* and isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on faba beans. Biological Control 8, 97-106.
- Juroszek, P., von Tiedemann, A., 2011. Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate. Plant Pathology 60, 100-112.
- MacLeod, B., Galloway, J., 2002. Faba bean: Fungicide control of leaf diseases. En: Department of Agriculture, Government of Western Australia. http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/pw/ph/dis/lp/fn081_2002.pdf
- Mohamed, H.A., Belal, M.H., Rahman, G.A., 1996. Fungicides Application in Relation to *Botrytis fabae* Sard. Egyptian Journal of Agricultural Research 74, 287-298.
- Nawar, H.F., Kuti, J.O., 2003. Weyerone acid phytoalexin synthesis and peroxidase activity as markers for resistance of broad beans to chocolate spot disease. Journal of Phytopathology 151, 564-570.
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science 144, 31-43.

- Oxenham, S.K., Svoboda, K.P., Walters, D.R., 2005. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology* 153, 174-180.
- Plessl, M., Heller, W., Payer, H.D., Elstner, E.F., Habermeyer, J., Heiser, I., 2005. Growth parameters and resistance against *Drechslera teres* of spring barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Scarlett) grown at elevated ozone and carbon dioxide concentrations. *Plant Biology* 7, 694-705.
- Pretty, J., 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 363, 447-465.
- Rabie, G.H., 1998. Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycopathologia* 141, 159-166.
- Rhaïem, A., Cherif, M., Kharrat, M., Cherif, M., Harrabi, M., 2002. New faba bean genotypes resistant to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 99-108.
- Rodríguez Sardiña, J., 1929. Una nueva especie de *Botrytis* que ataca a las habas. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural* XV, 291-295.
- Ruane, J., Sonnino, A., 2011. Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. *Journal of Biotechnology* 156, 356-363.
- Rubiales, D., 2010. Faba beans in sustainable agriculture Introduction. *Field Crops Research* 115, 201-202.
- Sahile, S., Fininsa, C., Sakhuj, P.K., Ahmed, S., 2008. Effect of mixed cropping and fungicides on chocolate spot (*Botrytis fabae*) of faba bean (*Vicia faba*) in Ethiopia. *Crop Protection* 27, 275-282.
- Sharga, B.M., 1997. *Bacillus* isolates as potential biocontrol agents against chocolate spot on faba beans. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 915-924.

- Shaw, M.W., Osborne, T.M., 2011. Geographic distribution of plant pathogens in response to climate change. *Plant Pathology* 60, 31-43.
- Siddique, K.H.M., Johansen, C., Turner, N.C., Jeuffroy, M.-H., Hashem, A., Sakar, D., Gan, Y., Alghamdi, S.S., 2012. Innovations in agronomy for food legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32, 45-64.
- Staats, M., van Baarlen, P., van Kan, J.A.L., 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 333-346.
- Stoddard, F.L., Nicholas, A.H., Rubiales, D., Thomas, J., Villegas-Fernandez, A.M., 2010. Integrated pest management in faba bean. *Field Crops Research* 115, 308-318.
- Strange, R.N., Scott, P.R., 2005. Plant disease: A threat to global food security. *Annual review of phytopathology*, pp. 83-116.
- Suso, M.J., Pierre, J., Moreno, M.T., Esnault, R., Le Guen, J., 2001. Variation in outcrossing levels in faba bean cultivars: role of ecological factors. *Journal of Agricultural Science* 136, 399-405.
- Tharanathan, R.N., Mahadevamma, S., 2003. Grain legumes - a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 14, 507-518.
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W.D., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223-253.
- Torres, A.M., Avila, C.M., Gutierrez, N., Palomino, C., Moreno, M.T., Cubero, J.I., 2010. Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* 115, 243-252.
- Vurro, M., Bonciani, B., Vannacci, G., 2010. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Security* 2, 113-132.

- Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., Hua, J., 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 498-506.
- Williamson, B., Tudzynsk, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561-580.
- Zhang, J., Wu, M.-D., Li, G.-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D.-H., Huang, H.-C., Zhuang, W.-Y., 2010. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia* 102, 1114-1126.

Capítulo I

Identificación y validación en múltiples ambientes de resistencia a *Botrytis fabae* en *Vicia faba*

Introducción

Es un principio aceptado que la mejor estrategia para combatir la botritis es el empleo de variedades resistentes (Rhaïem et al., 2002; Bouhassan et al., 2004). Para conseguir las, se requiere seleccionar fuentes de resistencia adecuadas. Los bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental en la conservación de las colecciones vegetales a partir de las cuales se realizan los procesos de selección (Duc et al., 2009). Aunque en los últimos 20 años se ha descrito algún material resistente (Tivoli et al., 2006; Sillero et al., 2010), se necesita más esfuerzo para incorporar resistencia a las variedades comerciales. Es más, no sólo es importante detectar resistencias sino que, una vez que se han encontrado, es preciso comprobar su estabilidad tanto en el tiempo como en el espacio, de ahí la importancia de llevar a cabo ensayos en múltiples localidades en diferentes años. Sin embargo, esto no se ha hecho siempre cuando se han estudiado fuentes potenciales de resistencia, pues las entradas de interés no se han evaluado en diferentes ambientes (Rhaïem et al., 2002; Bouhassan et al., 2004). La necesidad de los ensayos en diferentes ambientes (entendiendo ambiente como una localidad en un año determinado) se justifica por el hecho de que las interacciones genotipo x ambiente ($G \times A$) son comunes en los ensayos de campo de diversos cultivos (Carson et al., 2002; Hess et al., 2002; Pinnschmidt and Hovmoller, 2002; Brancourt-Hulmel and Lecomte, 2003; Forbes et al., 2005; Zinsou et al., 2005). Esto es de gran importancia para los programas de mejora, ya que interacciones $G \times A$ elevadas conllevan discrepancias entre las respuestas a la selección esperadas y las obtenidas, debido a un sesgo al alza en la estimación de las varianzas genéticas (Hausmann et al., 2001). Esto supone que sea difícil realizar predicciones sobre el comportamiento de las entradas en situaciones diferentes, lo que reduce su adaptabilidad regional (Dixon et al., 2002). Una alternativa a los ensayos en múltiples ambientes sería encontrar o crear un ambiente en el que se diesen simultáneamente dos condiciones (Carson et al., 2002): (i) la respuesta a la enfermedad se expresase consistentemente, de modo que representase un

amplio abanico de ambientes; (ii) debería permitir la máxima discriminación entre genotipos.

Desafortunadamente, a pesar de todo el conocimiento acumulado sobre las interacciones G x A, apenas ha habido estudios sobre las mismas en las evaluaciones de colecciones de germoplasma de *Vicia faba* para resistencia a estreses bióticos. Hasta la realización de este trabajo el único caso que habíamos encontrado era el de Flores et al. (1996) sobre resistencia a *Orobanche crenata* Forsk. Más recientemente se ha publicado un estudio para resistencia a *Ascochyta fabae* Speg. (Rubiales et al., 2012).

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Identificar fuentes de resistencia a *B. fabae* en una colección de germoplasma de *V. faba*.
- Evaluar la estabilidad de dichas fuentes de resistencia en diferentes ambientes.

Materiales y métodos

Se evaluó una colección de entradas de *V. faba* frente a *B. fabae* mediante nueve ensayos de campo en diferentes localidades y años (ver localidades en Figura 1).

Ensayos de campo

Material vegetal

El objeto de nuestro estudio ha sido una colección de 330 líneas de habas. La mayoría formaban parte de la colección de *V. faba* del IFAPA (Córdoba, España), que contiene entradas provenientes de todo el mundo.

También se emplearon entradas proporcionadas por el Dr. M. Kharrat (Túnez) y por el ICARDA (Aleppo, Siria).

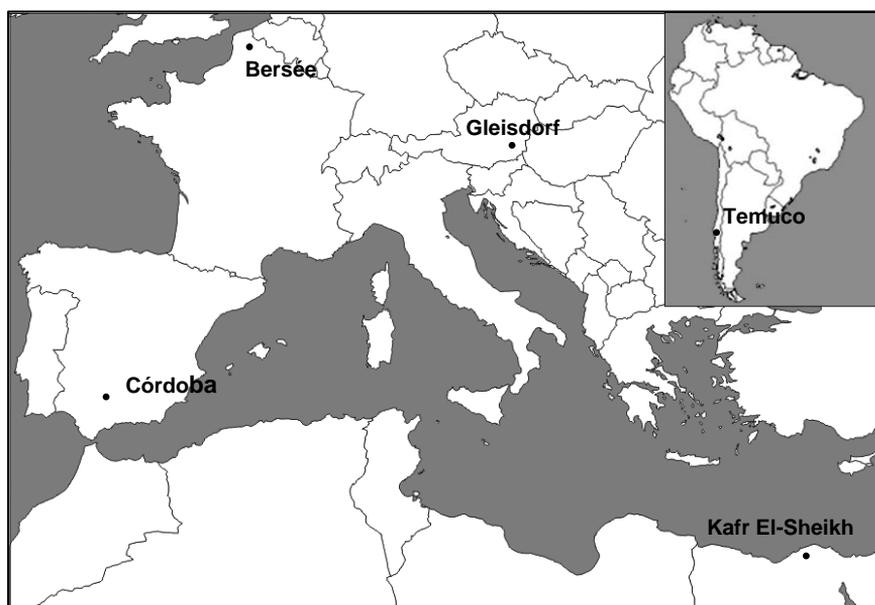
Diseño experimental

Se llevó a cabo un proceso de evaluación y selección durante cuatro años, con el objetivo de identificar aquellos genotipos que mostrasen un nivel interesante de resistencia a botritis. El esquema de este proceso fue el siguiente:

- Campaña 2002/2003. Se evaluó un total de 293 líneas de habas en un ensayo de campo en Córdoba (España). Se sembraron diez semillas de cada línea en surcos de 1 metro de longitud con 70 cm de separación entre surcos, en un ensayo sin repeticiones. El campo de ensayo se situó en un umbráculo de malla contra insectos para evitar la fecundación cruzada entre diferentes entradas.
- Campaña 2003/2004. Sesenta y dos entradas seleccionadas por su respuesta a la enfermedad en la temporada anterior se volvieron a evaluar en campo en Córdoba. Se empleó un diseño en bloques completamente al azar, con tres repeticiones. La variedad Rebaya 40, susceptible a *B. fabae*, se sembró cada dos surcos, de modo que se encontraba adyacente a cada línea evaluada; servía así de dispersor de la enfermedad, asegurando la presencia uniforme de la misma en todo el ensayo. La colección procedente de ICARDA “Faba International Chocolate Spot Nursery – 2003”, compuesta de 18 entradas, se evaluó en otro ensayo de campo con el mismo diseño experimental.
- Campaña 2004/2005. A partir de los resultados de los ensayos realizados en la campaña anterior se seleccionaron 46 líneas para ser estudiadas en un experimento múltiple en diferentes ambientes. Los ensayos se establecieron en cuatro lugares: Córdoba (España), Gleisdorf (Austria), Bersée (Francia) y Kafr El-Sheik (Egipto). El diseño experimental fue igual al descrito para la campaña 2003/2004.

- Campaña 2005/2006. Se repitió el experimento múltiple para las mismas 46 líneas. Las localidades fueron en esta ocasión las siguientes: Córdoba (España), Kafr El-Sheikh (Egipto) y Temuco (Chile).

Figura 1. Localidades en las que se realizaron los ensayos para el estudio en múltiples ambientes.



Inoculación

En la mayoría de los casos la infección natural dio lugar a un nivel aceptable de enfermedad. Sólo se decidió recurrir a la inoculación artificial en los ensayos de Córdoba y Bersée, ya que el historial de estos lugares mostraba que la incidencia de la enfermedad podía variar mucho de un año a otro, no garantizando en algunos casos un nivel de enfermedad suficiente para realizar una selección adecuada del material vegetal.

El procedimiento para preparar el inóculo y realizar las inoculaciones artificiales fue el siguiente: se sembraron 200 placas petri (de 9 cm de diámetro) con medio PDA (patata, dextrosa, agar) con un aislado local del patógeno correspondiente (de Córdoba o de Berseé) y se mantuvieron en oscuridad a 19 °C durante tres días. Después fueron sometidas a un ciclo de 12 horas de luz visible ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones) y 12 horas de oscuridad a la misma temperatura durante tres semanas. En el caso de Córdoba, el contenido de las placas se mezcló con arena estéril, previamente esterilizada dos veces en autoclave (120 °C durante una hora) y debidamente secada (40 °C durante 48 h). En el caso de Berseé, se siguió el protocolo descrito por Tivoli et al. (1986): se cortaron discos del medio donde había crecido el hongo, se mezclaron con granos de cebada y todo se incubó a 20 °C con luz natural durante un mes; los granos de cebada se habían introducido previamente en bolsas de plástico (250 ml de granos de cebada + 200 ml de agua) y esterilizado dos veces en autoclave (120 °C durante una hora). Las inoculaciones se realizaron distribuyendo el inóculo en el suelo del campo de experimentación. Tanto las mezclas de arena de Córdoba como la de granos de cebada de Berseé se distribuyeron uniformemente por sus respectivos campos experimentales, vertiéndolas a lo largo de cada surco de plantas, entre cuatro y ocho semanas después de la siembra.

Evaluación

La severidad de la enfermedad en cada línea se midió como el porcentaje del total de la superficie de la planta cubierta con lesiones de botritis. Se realizó una única evaluación cuando las plantas estaban en el estadio fenológico de llenado de vainas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos de severidad del experimento múltiple en diferentes ambientes, siendo los factores

fijos entrada y ambiente. El “ambiente” se definió como la combinación de una localidad y una campaña agrícola: cada ensayo en una campaña dada se consideró realizado en un ambiente independiente, de modo que el experimento múltiple constó de siete ambientes (Tabla 1). Al objeto de poder realizar una adecuada comparación visual de los resultados de los distintos ensayos del estudio múltiple, se obtuvo la “severidad estandarizada”, calculada como el porcentaje de la severidad de cada línea con respecto a la de la línea de mayor severidad en cada ensayo.

Para identificar aquellas entradas con mejores resultados en todos los ambientes, tanto en términos de severidad como de estabilidad, se realizaron análisis “biplot” de genotipo y genotipo por ambiente (GGA) (Yan et al., 2000), de los ensayos de las campañas 2004/2005 y 2005/2006. El biplot GGA es un método de análisis gráfico de datos procedentes de ensayos en múltiples ambientes: representa en un eje el efecto principal del genotipo, y en el otro el de la interacción genotipo x ambiente. Una de sus ventajas es que puede eliminar del análisis el factor ambiental.

El biplot se construye representando las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2, también denominadas como efectos primario y secundario, respectivamente) derivadas de la descomposición singular de los datos centrados por ambiente (Yan, 2002). La descomposición singular se obtiene usando un factor de escala (f) para obtener los valores de las entradas y los ambientes. Escogimos la variante más directa de este método, llamada escala simétrica ($f = 0,5$), ya que recoge la mayoría de las propiedades asociadas a otros métodos (Yan, 2002). Para evaluar la estabilidad de las entradas se utilizó la coordenada ambiental media (CAM), que se calcula como la media de CP1 y CP2 en todos los ambientes. Al unir este valor de CAM con el origen del biplot se obtiene el llamado “eje de abscisas CAM”. Los efectos

Tabla 1. Descripción de los ambientes (cada ambiente definido como una combinación de la localidad y la campaña) de los ensayos del estudio multiambiental. Se incluyen los datos climáticos tanto para toda la campaña como para los 30 días anteriores a la evaluación. (Máx. T, temperatura máxima; Mín. T, temperatura mínima; Precip., precipitaciones).

Ambiente	Localidad	Campaña	Latitud	Longitud	Campaña			30 días antes de la evaluación		
					Máx. T (°C)	Mín. T (°C)	Precip. (mm)	Máx. T (°C)	Mín. T (°C)	Precip. (mm)
ESPN05	España, Córdoba	2004/2005	37°51' N	4°47' 0	36,0	-8,3	200,2	32,6	5,0	4,2
EGPT05	Egipto, Kafr El-Sheikh	2004/2005	31°06' N	30°56' E	34,0	2,0	121,6	34,0	5,0	0,0
FRNC05	Francia, Bersée	2004/2005	50°28' N	3°08' E	31,7	0,5	123,8	28,6	9,9	78,0
AUST05	Austria, Gleisdorf	2004/2005	47°05' N	15°42' E	32,5	-2,8	343,9	32,0	7,4	122,7
ESPN06	España, Córdoba	2005/2006	37°51' N	4°47' 0	38,8	-2,0	362,0	28,9	7,5	59,0
EGPT06	Egipto, Kafr El-Sheikh	2005/2006	31°06' N	30°56' E	34,0	1,0	61,8	33,0	6,0	24,8
CHIL06	Chile, Temuco	2005/2006	38°43' S	72°32' 0	23,6	-2,8	1197,2	23,6	8,3	5,4

principales de los genotipos se representan mediante la proyección de los mismos sobre este eje. Esta proyección nos indica la contribución de cada genotipo a G, de modo que los genotipos se pueden ordenar a lo largo del eje de abscisas CAM, en orden creciente de severidades medias de izquierda a derecha. La perpendicular a este eje abscisas por el mismo origen define el eje de ordenadas CAM; la proyección de cada genotipo sobre este eje de ordenadas nos indica la contribución del mismo a la interacción G x A, lo que nos da información sobre su estabilidad o inestabilidad: aquéllos con la proyección mayor (en valor absoluto) son los menos estables. Por tanto, el mejor genotipo sería aquél que mostrase la menor severidad (o sea, el mayor valor negativo en su proyección sobre el eje de abscisas CAM) y la mayor estabilidad (es decir, un valor de su proyección sobre el eje CAM de ordenadas cercano a cero).

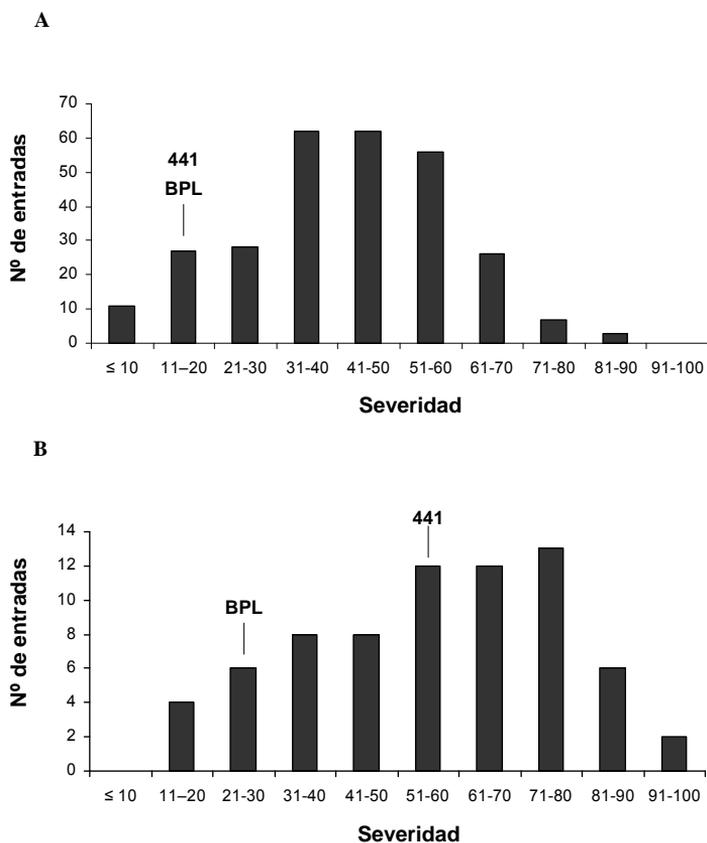
En cuanto al análisis de los ambientes, el ambiente “ideal” sería aquél que, por un lado, fuese más discriminante de los efectos principales de los genotipos, y por otro, fuese más representativo del conjunto de ambientes ensayados. Lo primero se corresponde con un valor de abscisa CAM elevado, y lo segundo con un valor pequeño (absoluto) de ordenada CAM (Yan, 1999; Yan et al., 2000).

Los análisis se han realizado con el programa estadístico SAS (SAS, 1996) utilizando la corriente de control desarrollada por Burgueño et al. (2003).

Resultados

Los ensayos de campo llevados a cabo durante las campañas agrícolas 2002/2003 y 2003/2004 en Córdoba, pusieron de manifiesto la existencia de un amplio rango de respuestas en el material evaluado (Figura 2), lo que permitió la selección de 46 entradas de interés. Estas entradas fueron evaluadas en ensayos en diferentes localidades a lo largo de las campañas 2004/2005 y

Figura 2. Distribución de las 282 entradas de *V. faba* evaluadas en campo en España por rangos de severidad en la campaña 2002/2003 (A) y de las 47 en la campaña 2003/2004 (B). Se indica la posición de las entradas BPL 710 y 441 para facilitar las comparaciones, ya que estas entradas presentaron medias de severidad muy diferentes en el ensayo en múltiples ambientes.



2005/2006. Al final de este proceso, se dispuso de resultados de 40 entradas en todos los ensayos. Estos resultados se presentan en la Tabla 2, en la que se dan tanto los valores de severidad de cada línea como su clasificación (la posición que ocupa cuando se ordenan según severidades crecientes). Las medias de los valores de severidad de todos los ensayos reflejan nuevamente un alto grado de variación. El comportamiento de cada entrada no es siempre el mismo en todos

Tabla 2. Severidad (Sev.), clasificación en orden creciente de severidad (Clas.) y error estándar (EE) de 40 entradas de *V. faba* en los 7 ambientes en los que fueron evaluadas por su respuesta a la enfermedad.

Entrada	Sev. AUST05	Clas. AUST05	Sev. ESPN05	Clas. ESPN05	Sev. EGPT05	Clas. EGPT05	Sev. FRNC05	Clas. FRNC05	Sev. CHIL06	Clas. CHIL06	Sev. ESPN06	Clas. ESPN06	Sev. EGPT06	Clas. EGPT06	Media sev.
BPL 1763	12,5	9	2,3	4	15,0	12	7,4	9	8,3	1	9,5	3	13,3	3	9,8
132-1 ⁽¹⁾	12,5	5	3,0	7	10,0	3	0,0	2	16,7	2	15,3	7	23,3	12	11,5
132-3 ⁽²⁾	4,2	2	3,5	10	23,3	23	11,1	13	33,3	5	17,0	9	11,7	1	14,9
135-1 ⁽³⁾	12,5	6	3,2	8	21,7	21	3,7	4	50,0	14	8,0	1	11,7	2	15,8
ILB 4726	0,0	1	0,8	1	21,7	22	11,1	17	50,0	17	17,2	10	13,3	4	16,3
158-1 ⁽⁴⁾	25,0	26	7,3	28	16,7	14	11,1	14	33,3	6	14,3	5	17,5	7	17,9
BPL 710	4,2	3	2,8	6	10,0	6	25,9	31	50,0	16	14,8	6	30,0	23	19,7
LPF 120	20,8	22	5,0	17	13,3	9	0,0	3	41,7	11	19,3	12	40,0	33	20,0
ILB 4709	20,8	19	1,7	2	8,0	1	14,8	20	33,3	7	47,5	26	20,0	9	20,9
ILB 5284	20,8	20	3,5	11	16,0	13	7,4	10	66,7	28	16,3	8	28,3	20	22,7
1809	12,5	4	4,5	14	32,3	31	18,5	24	33,3	4	35,0	20	25,0	13	23,0
174-1 ⁽⁵⁾	12,5	7	3,2	9	35,7	34	14,8	19	66,7	26	8,8	2	25,0	15	23,8
144	16,7	10	2,3	3	9,0	2	29,6	33	50,0	12	19,2	11	41,7	34	24,1
BG 977	25,0	28	5,5	18	10,0	5	7,4	7	58,3	21	42,7	23	26,7	19	25,1
BPL 1179	20,8	18	4,3	13	16,7	16	7,4	8	91,7	40	10,3	4	33,3	24	26,4
BG 1250	16,7	13	6,7	24	10,0	4	33,3	38	41,7	8	46,3	25	30,0	22	26,4
237	33,3	36	6,0	19	15,0	10	33,3	37	50,0	13	26,7	16	21,7	10	26,6
BG 1093	25,0	27	7,5	30	11,7	7	11,1	15	50,0	15	59,7	31	25,0	16	27,1
324	20,8	14	6,0	20	20,0	18	0,0	1	66,7	23	42,3	22	35,0	28	27,3
LPF 05	33,3	38	5,0	16	26,7	27	25,9	32	41,7	10	24,7	14	36,7	31	27,7
1647	25,0	24	4,3	12	26,7	25	14,8	18	66,7	24	20,7	13	43,3	35	28,8
095-3 ⁽⁶⁾	16,7	11	10,7	35	45,0	39	29,6	35	58,3	19	29,3	18	15,0	5	29,2

Entrada	Sev. AUST05	Clas. AUST05	Sev. ESPN05	Clas. ESPN05	Sev. EGPT05	Clas. EGPT05	Sev. FRNC05	Clas. FRNC05	Sev. CHIL06	Clas. CHIL06	Sev. ESPN06	Clas. ESPN06	Sev. EGPT06	Clas. EGPT06	Media sev.
BPL 261	33,3	37	6,2	21	11,7	8	22,2	29	75,0	32	25,2	15	33,3	25	29,6
LPF 113	20,8	21	8,2	32	28,3	28	14,8	21	50,0	18	52,3	28	33,3	26	29,7
BG 1122	16,7	12	2,8	5	45,0	40	7,4	6	66,7	27	50,7	27	20,0	8	29,9
BG 1095	12,5	8	10,3	34	15,0	11	7,4	5	83,3	37	57,3	29	25,0	17	30,1
BG 932	29,2	33	9,7	33	31,7	30	18,5	27	75,0	31	29,0	17	25,0	18	31,1
095-1 ⁽⁷⁾	20,8	15	7,5	29	38,3	35	11,1	12	83,3	36	36,0	21	25,0	14	31,7
BG 1261	29,2	32	7,8	31	16,7	15	25,9	30	58,3	20	44,3	24	43,3	37	32,2
BG 924	20,8	17	7,0	27	26,7	26	11,1	16	41,7	9	83,7	38	38,3	32	32,8
898	29,2	30	7,0	26	20,0	19	11,1	11	75,0	30	68,3	33	21,7	11	33,2
1196	25,0	23	6,8	25	33,3	32	22,2	28	83,3	35	34,3	19	30,0	21	33,6
LPF 95	29,2	35	6,5	22	16,7	17	14,8	23	58,3	22	62,0	32	50,0	40	33,9
1646	29,2	31	15,0	38	33,3	33	29,6	34	33,3	3	77,3	37	36,7	30	36,4
097-2 ⁽⁸⁾	25,0	25	6,7	23	31,7	29	18,5	25	91,7	38	68,3	34	15,0	6	36,7
LPF 44	25,0	29	10,8	36	20,0	20	14,8	22	75,0	34	76,0	36	43,3	38	37,9
LPF 39	29,2	34	4,5	15	23,3	24	29,6	36	75,0	33	86,0	39	33,3	27	40,1
441	37,5	39	14,2	37	45,0	38	40,7	39	75,0	29	58,7	30	36,7	29	44,0
107-1 ⁽⁹⁾	41,7	40	19,0	39	40,0	37	18,5	26	66,7	25	90,3	40	43,3	36	45,6
179-1 ⁽¹⁰⁾	20,8	16	19,8	40	38,3	36	40,7	40	91,7	39	73,7	35	50,0	39	47,9
Media sev.	21,7		6,7		23,2		16,9		57,9		40,5		29,3		28,0
EE	8,7		12,3		13,6		9,2		18,1		8,8		13,3		

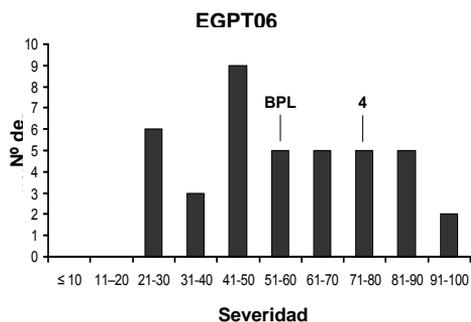
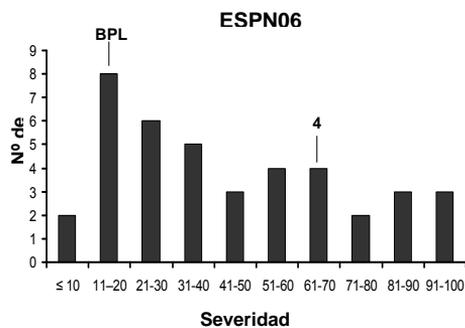
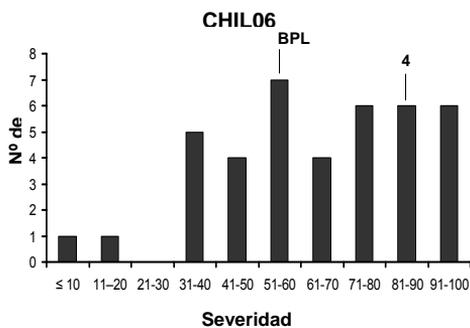
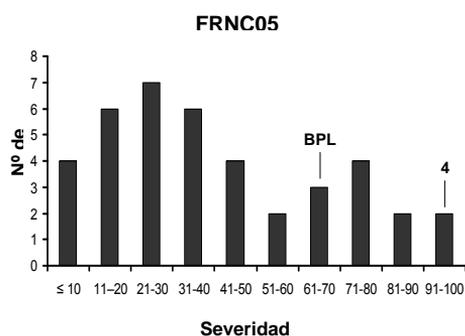
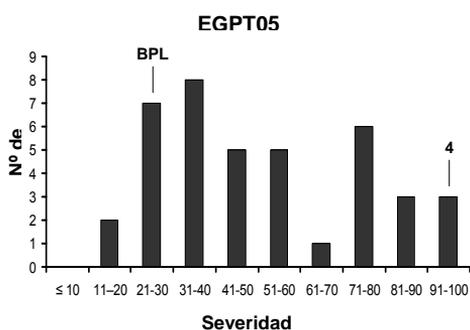
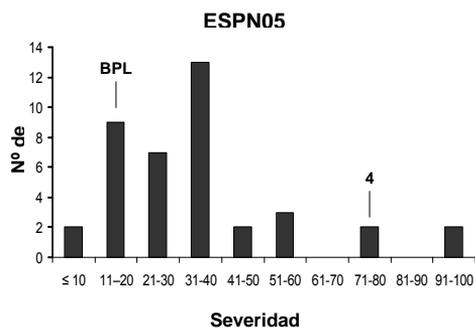
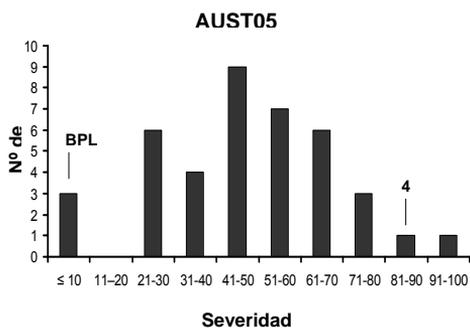
Nombres completos de aquellas entradas cuyos nombres se muestran abreviados: ⁽¹⁾ Sel.97 Lat.97 132-1; ⁽²⁾ Sel.97 Lat.97 132-3; ⁽³⁾ Sel.97 Lat.97 135-1; ⁽⁴⁾ Sel.97 Lat.97 158-1; ⁽⁵⁾ Sel.97 Lat.97 174-1; ⁽⁶⁾ Sel.97 Lat.97 095-3; ⁽⁷⁾ Sel.97 Lat.97 095-1; ⁽⁸⁾ Sel.97 Lat.97 097-2; ⁽⁹⁾ Sel.97 Lat.97 107-1; ⁽¹⁰⁾ Sel.97 Lat.97 179-1

los ambientes, lo que se puede apreciar mejor al estudiar el valor de clasificación que el valor de severidad, ya que los niveles de presión de enfermedad variaron de unos ambientes a otros. Esto también se ve confirmado por las diferentes distribuciones de frecuencia de las entradas en cada experimento, apuntando a una posible interacción genotipo x ambiente (Figura 3).

El ANOVA para el experimento en múltiples ambientes reveló que existen efectos significativos de genotipo, ambiente y de su interacción para la variable severidad (Tabla 3). De este modo, el 41% de la suma total de cuadrados se debió a los efectos ambientales, el 13% a los efectos de genotipo, y el 22% a la interacción entre ambos.

Al ajustar el modelo GGE, las dos primeras componentes principales (CP) explicaron el 76% de la variación (Figura 4), lo que sugiere que un biplot con CP1 y CP2 resulta una aproximación adecuada de los datos centrados por ambiente. Las entradas que se sitúan más alejadas del origen del gráfico delimitan los vértices de un polígono. Estos genotipos son aquéllos que más contribuyen a la interacción, es decir, aquéllos que muestran la mayor o menor severidad ante la enfermedad.

Figura 3 (página siguiente). Distribución de las 40 entradas de *V. faba* evaluadas en 7 ambientes (definidos en la Tabla 1) por rangos de severidad estandarizada. Los diferentes patrones sugieren una interacción genotipo x ambiente. Se indica la posición de las entradas BPL 710 y 441 para facilitar las comparaciones, ya que estas entradas presentaron medias de severidad muy diferentes



Comportamiento y estabilidad de los genotipos

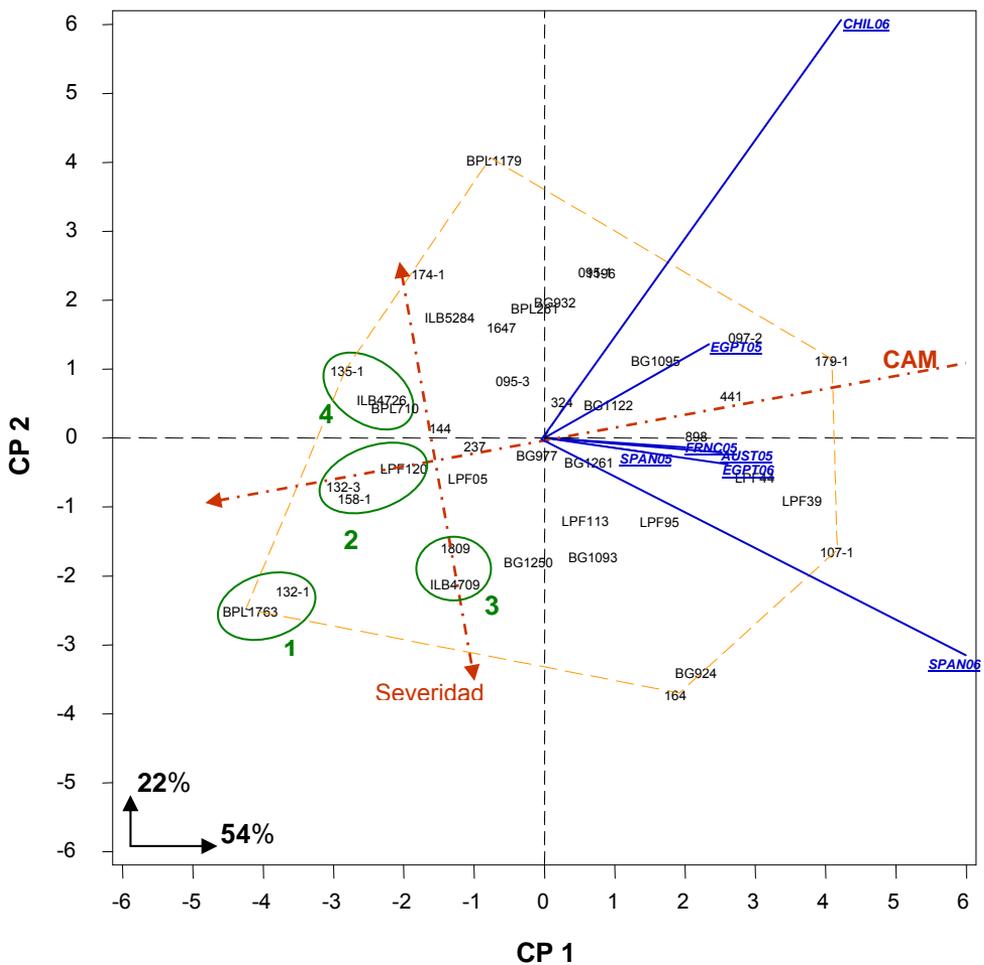
Se dibujó una perpendicular al eje de abscisas CAM que dejaba a la izquierda a aquellos genotipos con un valor medio de severidad en todos los ambientes inferior a 23% (Figura 4). Se pueden distinguir cuatro grupos diferentes de genotipos, según su comportamiento promedio y su estabilidad. El grupo 1 está constituido por dos genotipos (las severidades medias se indican entre paréntesis): BPL 1763 (9,8%) y 132-1 (11,5%). Estos dos genotipos muestran las menores severidades medias, pero también una moderada interacción negativa con los ambientes CHIL06 y EGPT05, tal y como indican sus signos opuestos, y una moderada interacción positiva con el resto de ambientes. El grupo 2 se compone de aquellos genotipos que muestran una respuesta proporcional a través de todos los ambientes, es decir, serían los genotipos más estables: 132-3 (14,9%), 158-1 (17,9%) y LPF 120 (20%). La entrada 132-3 destaca por su baja severidad, constante en todos los ambientes. El grupo 3 incluye las entradas 135-1 (15,8%), ILB 4726 (16,3%) y BPL 710 (19,7%), mientras que en el grupo 4 se encuentran ILB 4709 (19,8%) y 1809 (23%); ambos grupos muestran efectos principales similares, y una moderada interacción positiva: el grupo 3 presenta las severidades más bajas en aquellos ambientes (CHIL06 y EGPT05) en los que el grupo 4 tiene las mayores severidades, y viceversa.

Tabla 3. Análisis de varianza de los efectos de ambiente y genotipo en las severidad de las 40 entradas de *V. faba* evaluadas frente a *Botrytis* en 7 ambientes (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: fracción de la suma de cuadrados asociada a cada término o interacción).

Fuente	GL	SC	CM	F
Ambiente (A)	6	200899,49	33483,25***	40,72
Repetición	14	11452,54	818,04	
Genotipo (G)	39	62604,71	1605,25***	12,68
G x A	234	108450,76	463,46***	21,98
Error	542	109957,00	202,87	
Total	835	493364,50		

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

Figura 4. Biplot GGA de la primera y segunda componente principal (CP1 y CP2 respectivamente) basado en la severidad a *Botrytis* de 40 genotipos de *Vicia faba* en 7 ambientes. Los ambientes se muestran en azul, subrayados y en cursiva, con los vectores como líneas azules continuas. El porcentaje de la variación GGA explicado por cada componente principal se encuentra en la esquina inferior izquierda (22% y 54%). Los genotipos que más contribuyen a la interacción delimitan los vértices de un polígono (líneas discontinuas en naranja) que encierra al resto de las entradas. Las perpendiculares (líneas discontinuas rosas) desde el origen hasta los lados del polígono lo dividen en diferentes sectores; el genotipo en el vértice de cada sector es el que presentó la mayor severidad en los ambientes incluidos en ese sector. CAM es el eje de la “Coordenada ambiental media”, que une el origen con la media ambiental. Se ha trazado una perpendicular a este eje, que deja a la izquierda aquellos genotipos con una severidad inferior a 23%. Estos genotipos se han clasificado en cuatro grupos, según su severidad media y su estabilidad.



Evaluación de los ambientes

Cuando los datos no están escalados, es decir, divididos por la desviación estándar de cada ambiente, la variabilidad genotípica de cada ambiente queda representada por la longitud de su vector en el biplot (la línea que lo conecta con el origen) y de esta forma se puede observar cuán discriminante es dicho ambiente entre los genotipos ensayados. De este modo, un vector corto (ambiente cercano al origen) significaría un ambiente poco discriminante en el que todos los genotipos presentarían un comportamiento similar. Por tanto, basándose en esto, los ambientes CHIL06 y ESPN06 fueron los más discriminantes. En lo concerniente a la representatividad de un ambiente, aquellos cuyos vectores formen un ángulo pequeño con el eje AEC serán más representativos que los que tienen ángulos mayores. De este modo, los ambientes FRNC05 y AUST05 fueron los más representativos (ya que tenían proyecciones sobre el eje de abscisas CAM próximas a cero). La figura 4 muestra que las localidades evaluadas en la campaña 2004/2005 fueron más representativas y menos discriminantes que las evaluadas en la campaña 2005/2006.

Discusión

La evaluación de colecciones de germoplasma en el proceso de mejora por resistencia a enfermedades es una tarea que debe integrar diferentes estrategias. Entre las opciones disponibles, los ensayos de campo constituyen una de las herramientas más poderosas para identificar fuentes de resistencia, ya que reflejan las condiciones naturales a las que el material evaluado se verá sometido si llega a alcanzar los campos de cultivo. No obstante, este tipo de ensayos también acarrea la desventaja de la variación ambiental, de modo que las respuestas de las plantas pueden diferir de una situación a otra (Portapuglia et al., 1994; Pinnschmidt y Hovmoller, 2002). Como esto no es deseable, la estabilidad fenotípica se convierte en uno de los principales aspectos que habría que tener en cuenta en estos procesos de selección.

Esto ha constituido la lógica de este trabajo. Partiendo de un número relativamente alto de entradas, el primer objetivo fue obtener tan pronto como fuese posible una colección base de material de interés, que pudiera ser evaluada en ensayos en múltiples localidades en diferentes años. De este modo, mientras que el ensayo de la primera campaña de campo, 2002/2003, fue sólo una primera aproximación para eliminar aquellas líneas que eran claramente susceptibles a la enfermedad, el de la campaña 2003/2004 resultó crucial para establecer esa colección base. Por lo tanto, el diseño experimental de esta segunda campaña estuvo encaminado a obtener una presión y distribución de enfermedad homogénea que facilitara la discriminación entre las diferentes reacciones de huésped que pudieran presentarse. Para lograr este propósito se emplearon herramientas como la inoculación artificial, la intercalación de una variedad susceptible, y el diseño en bloques completamente al azar.

El modo de inoculación empleado en los ensayos de España y de Francia, distribuyendo el inóculo en el suelo del campo de experimentación, no es muy común en las evaluaciones de habas frente a hongos fitopatógenos aéreos. Aunque este tipo de inoculación había sido descrito y usado con anterioridad (Tivoli et al., 1986; Tivoli et al., 1988), en la mayoría de las evaluaciones de colecciones de *V. faba* para resistencia a botritis, la inoculación se he realizado pulverizando las plantas con una suspensión de esporas del patógeno (Hanounik y Robertson, 1988; Rhaïem et al., 2002; Bouhassan et al., 2004; Tivoli et al., 2006). Cuando se emplea este procedimiento de pulverización en el campo puede haber gran variación entre las dosis de inóculo que cada planta recibe. El método que hemos usado en nuestros ensayos, asegura por un lado una distribución del inóculo más homogénea en el campo. Por otro lado, también refleja mejor la manera en que tiene lugar la infección en la naturaleza.

El experimento en múltiples localidades en diferentes años se concibió como el último paso en el proceso de selección. El análisis individual de cada ensayo de campo puso de manifiesto diferencias en la respuesta de las entradas a la enfermedad, habiendo algunas que mostraban interesantes niveles de resistencia. Las variaciones en los valores de clasificación y los diagramas de distribución de frecuencias indican, sin embargo, que es necesario estudiar la estabilidad del material y su interacción con el ambiente. Se consideró que la diversidad tanto temporal como geográfica de los siete ensayos era suficiente para este tipo de investigación. El alto valor (41% de la suma de cuadrados total) de la variación debida al ambiente (A) demostró que los ambientes fueron diferentes y contrastantes, con variaciones importantes en sus severidades medias. De gran importancia es el valor de la interacción $G \times A$ (22%), 1,7 veces más alto que el de la variación debida al genotipo (G). Esto significa que hubo diferencias substanciales en la respuesta de los genotipos en los ambientes evaluados. Esta inconsistencia de la expresión fenotípica en diferentes ambientes es un problema frecuente en la búsqueda de resistencias, habiendo diferentes explicaciones posibles para el mismo: (i) razas del patógeno, es decir, existencia en las poblaciones locales del patógeno de virulencias específicas que se corresponden con genes de resistencia específicos en el material vegetal; (ii) sensibilidades particulares de las diferentes entradas al nivel total de severidad de cada ensayo, o a otros factores como las condiciones atmosféricas, propiedades del suelo o prácticas agrícolas (Pinnschmidt y Hovmoller, 2002). Aunque a partir de nuestros datos no es posible deducir la existencia de razas patogénicas, es una posibilidad que no debería descartarse, especialmente en aquellos lugares que han mostrado las mayores diferencias. En el modelo que hemos empleado para nuestro estudio, cuanto mayor es el ángulo entre dos ambientes en el biplot, más diferentes se los considera. Teniendo esto en cuenta, en nuestro caso los ambientes en los que el comportamiento global de los genotipos es más diferente son CHIL06 y ESPN06. Sería entonces interesante evaluar en experimentos en condiciones controladas los genotipos que muestran las mayores diferencias frente a aislados de estos lugares. Estos

estudios también podrían realizarse para los casos de otros ambientes, siempre que los genotipos evaluados sean aquellos que presenten la mayor interacción para ellos (mayor interacción opuesta G x A). Por ejemplo, las entradas 179-1 y 237 muestran diferentes comportamientos en los ensayos de Egipto y Austria: los valores de posición para 179-1 en Egipto son 36 y 39 (campañas 2004/2005 y 2005/2006, respectivamente), en contraste con su posición en Austria, que es 16. Por otra parte, la línea 237 es la número 10 en Egipto (en ambas campañas), mientras que cae hasta el final de la lista en Austria, alcanzando la posición 36. Lo mismo podría decirse de las entradas BG 1809 y LPF 05 en Austria y España, y en algunos otros ejemplos al hacer comparaciones de las diferentes localidades estudiadas. Este tipo de trabajos podría resultar de gran utilidad ya que, aunque se ha sugerido la existencia de razas de *Botrytis fabae* (Hanounik y Maliha, 1986), no tenemos constancia de que por el momento se haya llevado a cabo ninguna descripción exhaustiva de las mismas. Por lo que se refiere a los factores ambientales, la resistencia parcial (que es la encontrada en este estudio) puede ser sensible a los mismos, independientemente de su naturaleza génica: se sabe que la resistencia parcial poligénica se ve afectada por el ambiente (Hammerschmidt, 2006)

La estabilidad de la resistencia, por tanto, resulta ser clave para el proceso de mejora, incluso más importante que el valor medio de severidad de cada genotipo. Teniendo esto en cuenta, las mejores entradas serían, 132-3, 158-1 y LPF 120 (en este orden): todas presenta un nivel de severidad igual o menor al 20%, y muestran una alta estabilidad. Los otros grupos mencionados en la sección de resultados también deberían ser tenidos en cuenta para estudios futuros, pero considerando que sus buenos resultados frente a la enfermedad no resultan consistentes en todas las situaciones. Este es el caso de la línea BPL 710, una fuente de resistencia a *B. fabae* bien conocida (Bond et al., 1994), pero que muestra una interacción moderada con algunos ambientes. Las líneas 132-1 y BPL 1763 también deberían ser consideradas, ya que son las que poseen los valores de severidad más bajos, aunque carecen de un nivel de estabilidad

satisfactorio. Una estrategia posible podría ser emplear estos genotipos menos estables en aquellas regiones en las que se han obtenido los mejores resultados, pero debería hacerse con precauciones, ya que existe el riesgo de pérdida de la resistencia. Este tipo de evaluaciones en múltiples ambientes ayuda a seleccionar material cuya resistencia es más estable, probablemente poligénica, descartando aquella resistencia que podría estar basada en sólo uno o unos pocos genes, previniendo así una superación rápida de la resistencia por el patógeno (Pinnschmidt y Hovmoller, 2002). Posiblemente, la mejor opción sería combinar las mejores fuentes de resistencia en el mismo material, lo que ampliaría la base genética de la resistencia y, por ende, aumentaría su estabilidad. Esta aproximación también podría lograr que se aumentase el nivel de resistencia, dado que todas las entradas seleccionadas han mostrado una resistencia incompleta.

Los ambientes CHIL06 y ESPN06 resultaron ser los más discriminantes de la colección de entradas, aunque también los menos representativos del conjunto de ambientes. Parece que esto está relacionado con el nivel de presión de enfermedad alcanzado en cada ambiente, ya que CHIL06 y ESPN06 fueron las localidades con una severidad media total mayor. Esto tiene sentido ya que un nivel de enfermedad mayor ayudaría a discriminar mejor los genotipos, según se ha descrito con anterioridad (Carson et al., 2002), siempre que ese nivel de enfermedad no sea tan alto como para suprimir las diferencias entre ellos. En ningún ambiente, pues, coinciden alta discriminación y representatividad, confirmando que el ensayo en múltiples ambientes es la herramienta apropiada para seleccionar por resistencia frente a esta enfermedad.

En conclusión, este trabajo ha permitido la identificación de fuentes de resistencia a botritis con un gran potencial para su uso en programas de mejora. Todas ellas presentan una resistencia incompleta que, al menos en algunos casos, tiene probablemente una base poligénica, lo que debería facilitar la obtención de una resistencia durable en el material definitivo (Parlevliet, 2002).

El esquema empleado de ensayos de campo podría ser usado como modelo para futuras evaluaciones. El trabajo futuro debería orientarse a la confirmación de la resistencia en condiciones controladas y, una vez que esto se hubiese hecho, el siguiente paso sería la combinación de las diferentes fuentes de resistencia en el mismo fondo genético. Además, se ha obtenido información de utilidad para la posible identificación de razas de *B. fabae*.

Bibliografía

- Bond, D.A., Jellis, G.J., Rowland, G.G., Leguen, J., Robertson, L.D., Khalil, S.A., Lijuan, L., 1994. Present Status and Future Strategy in Breeding Faba Beans (*Vicia faba* L.) for Resistance to Biotic and Abiotic Stresses. *Euphytica* 73, 151-166.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., 2004. Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica* 135, 55-62.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Khiati, N.E., 2003. Analysis by detached leaf assay of components of partial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard. *Phytopathologia Mediterranea* 42, 183-190.
- Brancourt-Hulmel, M., Lecomte, C., 2003. Effect of environmental variates on genotype x environment interaction of winter wheat: A comparison of biadditive factorial regression to AMMI. *Crop Science* 43, 608-617.
- Burgueño, J., Crossa, J., Vargas, M., 2003. SAS programs for graphing GE and GGE biplots. Biometrics and Statistics Unit, CIMMYT, Int. Mexico.
- Carson, M.L., Goodman, M.M., Williamson, S.M., 2002. Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype x environment interaction in gray leaf spot trials. *Plant Disease* 86, 1090-1093.
- Crossa, J., Cornelius, P.L., 1997. Sites regression and shifted multiplicative model clustering of cultivar trial sites under heterogeneity of error variances. *Crop Science* 37, 406-415.
- Dixon, A.G.O., Ngeve, J.M., Nukenine, E.N., 2002. Genotype x environment effects on severity of cassava bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 763-770.

- Duc, G., Bao, S., Baum, M., Redden, B., Sadiki, M., Suso, M.J., Vishniakova, M., Zong, X., 2010. Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Research* 115, 270-278.
- Flores, F., Moreno, M.T., Martinez, A., Cubero, J.I., 1996. Genotype-environment interaction in faba bean: Comparison of AMMI and principal coordinate models. *Field Crops Research* 47, 117-127.
- Forbes, G.A., Chacon, M.G., Kirk, H.G., Huarte, M.A., Van Damme, M., Distel, S., Mackay, G.R., Stewart, H.E., Lowe, R., Duncan, J.M., Mayton, H.S., Fry, W.E., Andrivon, D., Ellisseche, D., Pelle, R., Platt, H.W., MacKenzie, G., Tarn, T.R., Colon, L.T., Budding, D.J., Lozoya-Saldana, H., Hernandez-Vilchis, A., Capezio, S., 2005. Stability of resistance to *Phytophthora infestans* in potato: an international evaluation. *Plant Pathology* 54, 364-372.
- Fox, P.N., Rosielle, A.A., 1982. Reducing the environment main effects on pattern analysis of plant breeding environments. *Euphytica* 31, 646-656.
- Gauch, H.G., Zobel, R.W., 1997. Identifying mega-environments and targeting genotypes. *Crop Science* 37, 311-326.
- Hammerschmidt, R., 2006. Organ type and age and the expression of defense. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69, 119-120.
- Hanounik, S.B., Maliha, N., 1986. Horizontal and vertical resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant Disease* 70, 770-773.
- Hanounik, S.B., Robertson, L.D., 1988. New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant Disease* 72, 696-698.
- Harrison, J.G., 1988. The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease - a review. *Plant Pathology* 37, 168-201.
- Hausmann, B.I.G., Hess, D.E., Reddy, B.V.S., Mukuru, S.Z., Kayentao, M., Welz, H.G., Geiger, H.H., 2001. Pattern analysis of genotype x environment interaction for striga resistance and grain yield in African sorghum trials. *Euphytica* 122, 297-308.

- Hess, D.E., Bandyopadhyay, R., Sissoko, I., 2002. Pattern analysis of sorghum genotype x environment interaction for leaf, panicle, and grain anthracnose in Mali. *Plant Disease* 86, 1374-1382.
- Parlevliet, J.E., 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124, 147-156.
- Pinnschmidt, H.O., Hovmoller, M.S., 2002. Genotype x environment interactions in the expression of net blotch resistance in spring and winter barley varieties. *Euphytica* 125, 227-243.
- Portapuglia, A., Bernier, C.C., Jellis, G.J., Kaiser, W.J., Reddy, M.V., 1994. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by fungi and bacteria in cool-season food legumes. *Euphytica* 73, 11-25.
- Rhaïem, A., Cherif, M., Kharrat, M., Cherif, M., Harrabi, M., 2002. New faba bean genotypes resistant to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 99-108.
- Rubiales, D., Avila, C.M., Sillero, J.C., Hybl, M., Narits, L., Sass, O., Flores, F., 2012. Identification and multi-environment validation of resistance to *Ascochyta fabae* in faba bean (*Vicia faba*). *Field Crops Research* 126, 165-170.
- SAS Institute. 1996. SAS/STAT Software: changes and enhancements through release 6.11. Cary, N.C.
- Sillero, J.C., Villegas-Fernandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fernandez-Aparicio, M., Rubiales, D., 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115, 297-307.
- Tivoli, B., Berthelem, D., Le Guen, J., Onfroy, C., 1986. Comparison of some methods for evaluation of reaction of different winter faba bean genotypes to *Botrytis fabae*. *FABIS Newsletter* 16, 46-51.
- Tivoli, B., Berthelem, D., Le Guen, J., Onfroy, C., 1988. A Study of the Performance of Certain Faba Bean Genotypes in Relation to *Botrytis fabae* and *Ascochyta fabae* in France. *FABIS Newsletter* 21, 36-39.

-
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W.D., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223-253.
- Yan, W. 1999. Methodology of cultivar evaluation based on yield trial data with special reference to winter wheat in Ontario, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Yan, W., 2002. Singular value partitioning for biplot analysis of multi-environment trial data. *Agronomy* 94, 990-996.
- Yan, W., Hunt, L.A., Sheng, Q., Slavnic, Z., 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Science* 40, 597-605.
- Zinsou, V., Wydra, K., Ahohuendo, B., Hau, B., 2005. Genotype x environment interactions in symptom development and yield of cassava genotypes with artificial and natural cassava bacterial blight infections. *European Journal of Plant Pathology* 111, 217-233.

Capítulo II

Métodos de evaluación de *Vicia faba* frente a *Botrytis fabae* e influencia de la edad del tejido del huésped y de la temperatura

Introducción

La mayoría de las búsquedas de resistencia se llevan a cabo mediante ensayos de campo. Esto es lógico, ya que estos ensayos someten al material vegetal a las condiciones naturales que encontrará si finalmente forma parte de una variedad comercial cultivada. Como hemos visto en el capítulo 1, si se desean obtener resultados fiables, es conveniente realizar experimentos en varias localidades en diferentes años, de modo que se identifique el material más estable: la variación debida al ambiente es normalmente demasiado alta, y los experimentos en múltiples ambientes sirven para eliminar esta variación, centrándose en los efectos del genotipo y de la interacción genotipo x ambiente (Yan, 2002). Sin embargo, la búsqueda de resistencia no se apoya exclusivamente en la experimentación en campo: los ensayos de laboratorio son un complemento necesario e imprescindible a las pruebas en campo. En el laboratorio se pueden hacer evaluaciones en condiciones controladas, de modo que se minimizan los efectos del ambiente frente a los efectos de los genotipos. Otra ventaja es que los resultados se obtienen en un periodo de tiempo mucho más corto que en el caso de los ensayos de campo. En concreto, los principales objetivos de los experimentos en condiciones controladas en el laboratorio son dos: (i) comparar las reacciones de las diferentes entradas a la enfermedad en las mismas condiciones microclimáticas, eliminando los efectos ambientales; (ii) ayudar en la identificación de fuentes de resistencia útiles cuando los ensayos de campo no pueden llevarse a cabo; en este caso, los resultados de los experimentos de laboratorio deberían ser predictivos de y consistentes con los de los ensayos de campo. Esto puede parecer contradictorio: por una parte, se desea aislar el material vegetal tanto como se pueda de las impredecibles condiciones ambientales que se dan en el campo; por otra parte, se considera que las evaluaciones en ambientes controlados son realmente prácticas y beneficiosas para los mejoradores vegetales cuando reproducen con exactitud las evaluaciones en campo (Ricard and Johnston, 2005), es decir, cuando hay una buena correlación estadística entre los resultados en ambientes controlados

y los de campo. Esta aparente contradicción se resuelve al comprender que los ensayos de laboratorio deben reflejar de un modo fiable el desarrollo de la infección en la naturaleza, pero haciéndolo bajo condiciones controladas y conocidas. Por ello, este tipo de experimentos se consideran como un complemento a los ensayos de campo, que aportan información adicional sobre la expresión de la resistencia o la susceptibilidad de los diferentes materiales.

Es obvio que los resultados de los experimentos de laboratorio en condiciones controladas no se corresponden siempre adecuadamente con los de los ensayos de campo. Desde un punto de vista práctico, se considera que los coeficientes de correlación entre los ensayos de laboratorio y los de campo son una buena medida de la idoneidad de los experimentos en condiciones controladas en diferentes sistemas patogénicos, permitiendo diferenciar los que son útiles (Kuntze et al., 1997; Foolad et al., 2000; Tahi et al., 2006; Twizeyimana et al., 2007) de los que no (Smith et al., 2003; Ricard and Johnston, 2005). El umbral de decisión puede variar de un sistema a otro, pero, como regla general, se podría aceptar que coeficientes de correlación mayores de 0,7 indican correlaciones altas, mientras que los que estuviesen entre 0,5 y 0,7 indicarían correlaciones moderadas (Kuntze et al., 1997; Kim et al., 2000; Driscoll et al., 2009). Desde nuestro punto de vista, cualquier coeficiente inferior a 0,5 debería considerarse como correspondiente a una baja correlación.

En el caso de la botritis, el ensayo en hoja cortada es el empleado mayoritariamente para los estudios en laboratorio. No sólo ha permitido evaluar el material, sino también llevar a cabo otros tipos de investigaciones sobre la respuesta de *Vicia faba* a *Botrytis fabae*: por ejemplo analizar los componentes de las distintas respuestas de resistencia o establecer el modo en que diferentes factores influyen en la interacción planta-patógeno (Hutson and Mansfield, 1980; Hanounik and Robertson, 1988; Cole et al., 1996; Bouhassan et al., 2003; Bouhassan et al., 2004a; Staats et al., 2007). No obstante, este tipo de ensayo presenta algunas desventajas, como el hecho de que no siempre discrimina

correctamente entre los diferentes grados de resistencia o susceptibilidad a la infección por el patógeno (Bouhassan et al., 2004a). Existe, sin embargo, otro tipo de ensayos en planta completa, que, aunque ampliamente utilizados en otros patosistemas de leguminosas (Tivoli et al., 2006), apenas se han empleado en el caso de *V. faba* / *B. fabae* (Tivoli et al., 1986). La ventaja principal de estos ensayos en planta completa sobre los de hoja cortada es que permite estudiar la planta como un organismo completo que interacciona con el patógeno, en lugar de limitarse a algunas hojas aisladas.

Por otra parte, se sabe que un gran número de factores, desde fisiológicos a ambientales, influyen en los sistemas patogénicos vegetales, ya sea porque afectan al huésped, al patógeno, o a la interacción entre ambos. En el caso de *V. faba* / *B. fabae*, es conocido que la edad de la planta es un factor destacado, de modo que en una planta las hojas más jóvenes son menos susceptibles a la infección por *B. fabae* que las más viejas (Deverall and Wood, 1961; Creighton et al., 1986; Harrison, 1988; Heilbronn and Harrison, 1989; Bouhassan et al., 2004b). Los estudios realizados, sin embargo, se llevaron a cabo con un pequeño número de entradas de *V. faba*, de modo que sería conveniente confirmar sus conclusiones en un conjunto más amplio de genotipos. La influencia de la edad de la planta, por el contrario, ha sido poco investigada (Bouhassan et al., 2004b), a pesar de ser un elemento relevante en el estudio de las resistencias a enfermedades (Develey-Riviere and Galiana, 2007). Lo mismo puede decirse del efecto de la temperatura, que a pesar de su importancia en el proceso de infección (Harrison, 1988), apenas ha sido estudiada su relación con la resistencia (Bouhassan et al., 2007).

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Realizar una comparación crítica de los diferentes métodos de evaluación y su conveniencia para la selección en mejora y para la caracterización de los componentes de resistencia.
- Identificar y validar fuentes de resistencia a *B. fabae* con utilidad potencial en el sur de España.
- Estudiar la influencia de la edad de la hoja, la edad de la planta y de la temperatura en la respuesta de diferentes genotipos a la enfermedad.

Materiales y métodos

Para este estudio se eligieron las 42 entradas de *V. faba* que fueron comunes a los ensayos de campo en Córdoba de las campañas 2004/2005 y 2005/2006 descritos en el capítulo 1. Fueron evaluadas tanto en ensayo en hoja cortada como en ensayo en planta completa en condiciones controladas en laboratorio. Finalmente, la influencia de la edad de la planta y de la temperatura se abordó mediante un ensayo en planta completa, estudiando la respuesta a la infección de un grupo de entradas con dos diferentes edades de planta a tres temperaturas distintas.

Ensayos de campo

La metodología seguida con los ensayos de campo ya ha sido descrita en el capítulo anterior. Aun cuando para ese estudio sólo se tomaron para los análisis los datos de una sola evaluación final, en el caso particular de estos ensayos de Córdoba las evaluaciones comenzaron dos semanas después de la inoculación, cuando los primeros síntomas de botritis eran visibles. Estas evaluaciones se repitieron cada 12-14 días, hasta un total de 4, terminando en el estadio fenológico de llenado de vaina.

Ensayo en hoja cortada

Material vegetal

Se sembró una semilla de cada entrada en una maceta de plástico de un litro de volumen llena con una mezcla de arena y turba (1:1, v:v). El número de repeticiones por entrada varió entre 3 y 4. Las macetas se situaron en una cámara en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y luz visible (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ de intensidad de luz). El fotoperiodo fue de 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

Material patológico

Para este experimento se empleó un aislado monospórico de *B. fabae* procedente de Córdoba (Bf-CO-05), recogido en campañas anteriores en un campo de habas infectado naturalmente, y debidamente purificado y multiplicado. Se sembró en placas Petri (9 cm de diámetro) que contenían medio PDA (patata, dextrosa, agar) y se mantuvo durante 3 días en oscuridad en un incubador a 19 °C. Posteriormente se expuso a un ciclo de 12 horas de luz (visible + ultravioleta cercano) y 12 horas de oscuridad a la misma temperatura durante 3 semanas, tras las cuales el contenido de cada placa se cortó en pequeños trozos con un bisturí. Estos trozos se incorporaron a un matraz en el que había medio V8 (270 ml de zumo V8, 30 ml de agua desionizada y 3 g de agar, a pH 5,5) esterilizado en autoclave y todavía líquido (cada placa Petri se distribuyó en dos matraces). Esta mezcla se vertió sobre placas Petri estériles y se cultivó durante 7 días en las mismas condiciones de luz y temperatura anteriores. Tras ese período, una capa de micelio en esporulación cubría todas las placas.

Inoculación

Se cortó un foliolo de cada una de las hojas completamente expandidas de cada planta dos semanas después de la siembra, y se situaron en placas Petri cuadradas (15 x 15 cm) que contenían medio agar-agua (0,4% p/v). El número

de foliolos tomados de cada planta varió entre 2 y 4, dependiendo del grado de desarrollo. Cada placa Petri cuadrada contenía todos los foliolos tomados de una misma planta.

Se preparó una suspensión de esporas en medio líquido a partir de los cultivos de *B. fabae* en V8. Se vertió una solución de glucosa (1,2% p/v) en cada placa (10 - 15 ml por placa), y se liberaron las esporas haciendo pasar por la superficie de la misma un asa de siembra. Esta suspensión se filtró a través de una malla de nylon (200 micras de paso) para eliminar restos de micelio. La concentración de esporas se calculó con un hematocímetro, y se diluyó con la solución de glucosa hasta alcanzar una concentración de esporas de 170.000 esporas/ml. Finalmente, se añadió Tween-20 a la suspensión (0,03% v/v).

La inoculación se llevó a cabo depositando una gota de 5 μ l de la suspensión de esporas en cada foliolo, cerca del nervio central. Las placas Petri se cubrieron con sus tapas, y se incubaron en una cámara de crecimiento a 20 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz visible ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz) y 10 horas de oscuridad. Tras 24 horas, se añadió 1 ml de agua a cada placa Petri, sin tocar los foliolos, para garantizar alta humedad en el interior de la misma.

Evaluación

A las 24 horas de la inoculación ya se distinguían claramente puntos oscuros en el lugar en que se depositaron las gotas. Estos puntos dieron lugar a lesiones únicas 24 horas más tarde. Las longitudes de los diámetros de las mismas se midieron a los 2, 3 y 6 días tras la inoculación, y se calcularon las correspondientes áreas (ver Figura 1). Se calculó para cada planta el *tamaño medio de lesión* como la media de las áreas de las lesiones de todos sus foliolos en un tiempo de evaluación dado. Con estos datos, se obtuvo el *tamaño medio de lesión final* (siendo el área media de las lesiones a los 6 días después de la inoculación).

Figura 1. Ensayo de hoja cortada en placa Petri. Las hojas mostradas pertenecen a una planta del genotipo susceptible ILB 365, seis días después de la inoculación. Están dispuestas en orden decreciente de edad, siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Las flechas señalan el lugar donde se depositó la gota con la solución de esporas.



Ensayo en planta completa

Material vegetal

Las entradas seleccionadas para este experimento fueron las mismas que para el ensayo en hoja cortada, y el material vegetal se manejó del mismo modo.

Material patológico

Se usó el mismo aislado monospórico empleado para el ensayo en hoja cortada. Los cultivos se obtuvieron como se ha descrito más arriba.

Inoculación

La suspensión de esporas se preparó de igual manera que en el ensayo de hoja cortada, aunque la concentración final fue de 450.000 esporas/ml.

Cuando las plantas tenían tres semanas de edad (estadio: 4-6 hojas plenamente expandidas), se les pulverizó la suspensión de esporas (aproximadamente 1,5 ml de suspensión por planta), con la ayuda de un atomizador. Luego las plantas se mantuvieron en una cámara de incubación durante toda la noche, en oscuridad y a temperatura ambiente, con una humedad relativa superior a 95%. Posteriormente se las trasladó a la cámara en la que habían crecido, donde la humedad relativa se mantuvo por encima del 90% (Figura 2).

Evaluación

Como criterio de evaluación se consideró la severidad de la enfermedad en planta completa y en hojas individuales, y el daño en tallos. La severidad de la enfermedad en cada entrada se estimó como el porcentaje de la superficie de la planta cubierta por lesiones de botritis. También se estimó la severidad individual de cada hoja expandida, como porcentaje de superficie de la misma cubierta con lesiones. El daño en los tallos fue igualmente evaluado, según la escala descrita por Rhaïem et al. (2002) y que comprende 4 estados, numerados del 0 al 3: 0, sin infección visible; 1, unas pocas lesiones dispersas; 2, numerosas lesiones; 3, lesiones muy numerosas y coalescentes. Todas las evaluaciones se realizaron a los 2, 4 y 6 días tras la inoculación.

Otro objetivo de este experimento era detectar la variación, si la hubiera, de la severidad con la edad del foliolo. Para hacer esto, los datos de cada planta se procesaron de la siguiente manera: se calculó la severidad de las hojas situadas en la mitad inferior de la planta (hojas más viejas), y lo mismo se hizo con las de la mitad superior (hojas más jóvenes). De este modo, se disponía de dos datos por planta, un valor de severidad para cada mitad.

Figura 2. Ejemplo de ensayo en planta completa en cámara en condiciones controladas. Los humidificadores permiten mantener una humedad relativa superior al 90%, lo que favorece el desarrollo de la enfermedad tras la inoculación.



Influencia de la edad de la planta y la temperatura

Material vegetal

Los genotipos para este experimento se seleccionaron en función de su comportamiento en el ensayo en planta completa: BPL 710, ILB 365, ILB 4709, 237, 324, 544 y 1809. Se escogieron porque habían cubierto un amplio rango de respuestas a la infección de botritis en el ensayo en planta completa, y mostrado buena correlación con los ensayos de campo; además, habían presentado diferentes respuestas para el efecto de la edad de la hoja. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en los anteriores experimentos.

La siembra se hizo en dos tiempos, para así tener plantas de dos edades diferentes: primero se sembraron 63 semillas (9 de cada entrada), y, tres semanas más tardes, otras 63, de modo que hubiese tres repeticiones de cada tratamiento; para simplificar, las denominaremos de aquí en adelante como plantas *adultas* y *jóvenes*, respectivamente.

Material patológico, inoculación y evaluación

Los procedimientos fueron los mismos que en el previo ensayo en planta completa, con algunos cambios. La inoculación se hizo 7 semanas después de la siembra de las primeras semillas, cuando las plantas adultas tenían entre 13 y 20 hojas expandidas (de modo que las plantas jóvenes eran de 4 semanas y tenían entre 8 y 10 hojas expandidas). A cada planta se le pulverizó aproximadamente 2 ml de una suspensión de esporas (320.000 esporas/ml). Después de la inoculación las plantas fueron distribuidas en tres cámaras de crecimiento, cada una a una temperatura diferente: 13, 20 y 25 °C. En cada una de ellas se colocaron 6 plantas de cada entrada (3 adultas y 3 jóvenes), se incubaron en oscuridad y con una humedad relativa superior al 90% durante toda la noche y después se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas de luz visible y 12 horas de oscuridad con la misma humedad relativa.

La evaluación se realizó 8 días después de la inoculación. La severidad se evaluó como en el ensayo de planta completa anterior. Las medias de las severidades de las mitades inferior y superior de cada planta fueron calculadas como se ha explicado en el apartado anterior. En este caso no se evaluó el daño en los tallos.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para los diferentes parámetros evaluados en los distintos experimentos. Los datos de los ensayos de campo y de planta completa se transformaron mediante la expresión arcsen

\sqrt{x} antes de realizar con ellos ningún cálculo estadístico, con el fin de compensar el sesgo en la evaluación al emplear porcentajes, y para incrementar la normalidad de la distribución de los datos. En los casos en que fue necesario, el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC por sus siglas en inglés) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \{(y_{i+1} + y_i)(x_{i+1} - x_i)\}$$

y_i = valor del parámetro evaluado en el día i

x_i = tiempo en días

n = número total de observaciones

En los ensayos de campo, los resultados de las diferentes entradas fueron comparados a los del testigo susceptible ILB 365 mediante el test de Dunnett. En los ensayos en condiciones controladas, cuando fue necesario las medias de los diferentes parámetros se separaron mediante pruebas LSD ($p = 0,05$).

En el caso del ensayo de hoja cortada, los diámetros de las lesiones se correlacionaron con el tiempo mediante el análisis de Pearson, para comprobar si el crecimiento de las lesiones sigue un patrón lineal. Posteriormente se realizaron las correspondientes regresiones lineales por el método de mínimos cuadrados, y la pendiente de las mismas constituyó el índice de crecimiento de cada lesión, que es un importante componente epidémico (Berger et al., 1997).

Las comparaciones entre los ensayos de laboratorio y los de campo se hicieron igualmente mediante análisis de correlación de Pearson entre los diferentes parámetros empleados.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EEUU).

Resultados

Ensayos de campo

El análisis de los datos de los dos ensayos de campo puso de manifiesto la existencia de un amplio rango de respuestas en los valores de AUDPC de las diferentes entradas, y de diferencias significativas entre las mismas (ANOVA, $p < 0,001$). El nivel de enfermedad fue menor en la campaña 2004/2005 que en la 2005/2006 (valores de AUDPC de 255 y de 1544,8 para el testigo susceptible ILB 365 respectivamente). A la hora de realizar la comparación con los métodos de laboratorio se calculó la media de los resultados de ambos ensayos de campo, para así minimizar la variación ambiental (Tabla 1).

Ensayo en hoja cortada

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las entradas para el tamaño medio de lesión final y para los valores de AUDPC del tamaño medio de lesión ($p < 0,0001$ para ambos parámetros). Los resultados del tamaño medio de lesión final se muestran en la Tabla 1 (los valores abarcaron desde 135,2 mm² en el caso de la línea 132-1 hasta 3.162,4 mm² para la variedad Brocal).

Los análisis de correlación de Pearson permitieron concluir que el crecimiento de las lesiones sigue un patrón lineal (datos no mostrados). El índice de crecimiento de la lesión, expresado como la pendiente de la recta de regresión (“m”), se muestra en la Tabla 1. El análisis de varianza también detectó diferencias significativas para este parámetro (datos no mostrados).

Tabla 1. Respuesta a *Botrytis fabae* de 42 entradas de *Vicia faba*, en campo y en cámaras de crecimiento en condiciones controladas.

Entrada	Ensayos de campo				Ensayos en condiciones controladas						
	2005 ⁽¹⁾	2006 ⁽¹⁾	Media ⁽²⁾	Clas. ⁽³⁾	Hoja cortada				Planta completa		
					rTML (%) ⁽⁴⁾	AUDPC ⁽⁵⁾	m ⁽⁶⁾	Clas. ⁽⁷⁾	rS (%) ⁽⁸⁾	AUDPC ⁽⁹⁾	Clas. ⁽¹⁰⁾
135-1⁽¹¹⁾	16,7*	13,9*	14,3	1	10,6*	736,8*	1,3	5	9,0*	19,1*	3
BPL 1763	10,3*	15,9*	15,1	2	16,3*	858,5*	1,7	12	19,4*	47,7*	12
174-1⁽¹²⁾	30,6*	16,3*	18,3	3	34,8*	1715,0*	2,4	23	10,4*	24,1*	5
BPL 710	14,1*	20,4*	19,5	4	45,6*	2115,8*	3,0	32	8,9*	21,8*	2
132-1⁽¹³⁾	22,6*	22,2*	22,3	5	4,9*	388,0*	0,9	1	16,6*	36,6*	10
ILB 4726	15,0*	24,9*	23,5	6	6,8*	516,9*	1,1	2	8,7*	21,2*	1
ILB 5284	38,6*	22,9*	25,1	7	21,2*	1118,5*	1,9	15	14,7*	34,7*	8
LPF 120	37,2*	24,9*	26,6	8	24,5*	1244,6*	2,0	17	42,7*	76,1	27
132-3⁽¹⁴⁾	36,8*	25,0*	26,7	9	17,7*	959,7*	1,8	13	33,6*	77,7	21
144	32,3*	25,9*	26,8	10	44,4*	2090,0*	2,8	31	77,1	120,5	34
158-1⁽¹⁵⁾	78,3	24,0*	31,6	11	11,1*	702,9*	1,5	6	16,4*	37,9*	9
1647	36,3*	31,2*	32,0	12	42,5*	1999,5*	2,9	29	62,6	127,1	30
LPF 05	44,8*	31,4*	33,3	13	15,1*	812,7*	1,3	9	37,4*	56,1*	24
152-1⁽¹⁶⁾	60,4	29,7*	34,0	14	10,1*	587,1*	1,2	4	11,1*	26,7*	6
BPL 261	50,3	33,6*	36,0	15	58,3	2734,8	3,7	35	26,8*	60,0*	16

Tabla 1. Continuación

Entrada	Ensayos de campo				Ensayos en condiciones controladas						
	2005 ⁽¹⁾	2006 ⁽¹⁾	Media ⁽²⁾	Clas. ⁽³⁾	Hoja cortada				Planta completa		
					rTML (%) ⁽⁴⁾	AUDPC ⁽⁵⁾	m ⁽⁶⁾	Clas. ⁽⁷⁾	rS (%) ⁽⁸⁾	AUDPC ⁽⁹⁾	Clas. ⁽¹⁰⁾
ILB 4709	10,5*	40,6*	36,4	16	39,4*	1905,4*	2,7	28	9,1*	23,9*	4
1809	33,9*	39,5*	38,7	17	9,8*	606,2*	1,3	3	32,2*	47,5*	20
237	61,3	37,9*	41,2	18	25,7*	1314,6*	2,5	19	90,7	139,4	39
324	52,6	40,5*	42,2	19	13,0*	805,9*	1,6	7	28,1*	57,4*	18
BG 257	89,4	36,1*	43,7	20	67,8	3245,6	4,1	37	87,6	193,0	38
095-3⁽¹⁷⁾	106,2	33,7*	43,9	21	33,2*	1693,7*	2,6	22	41,3*	80,4	26
097-2⁽¹⁸⁾	53,0	44,6*	45,8	22	39,0*	1857,7*	2,6	27	33,8	74,7	22
BG 977	42,3*	46,8*	46,2	23	44,0*	2083,0*	3,2	30	14,5*	33,8*	7
BG 1222	26,5*	52,1*	48,5	24	68,8	3154,9	3,9	38	72,9	159,1	33
095-1⁽¹⁹⁾	68,5	47,7*	50,6	25	25,3*	1324,6*	2,1	18	31,5*	62,4	19
BG 1261	66,1	48,8*	51,2	26	59,0	2717,2	3,3	36	35,4*	59,7	23
BG 1250	66,6	48,9*	51,4	27	87,9	3926,4	4,0	39	20,7*	46,7*	13
BG 1095	67,8	49,5*	52,1	28	35,6*	1711,2*	2,6	25	86,2	163,5	36
LPF 95	56,0	56,2*	56,2	29	15,3*	847,3*	1,6	10	79,1	170,0	35
898	58,1	56,6*	56,8	30	23,2*	1282,7*	2,1	16	27,7*	50,7*	17
BG 1093	58,1	57,2*	57,3	31	32,8*	1501,7*	2,4	21	17,5*	32,7*	11
LPF 39	43,7*	60,3*	58,0	32	13,6*	769,2*	1,5	8	22,8*	47,1*	15
Brocal	68,2	60,5*	61,6	33	115,0	5037,7	5,2	41	48,1	98,7	28
441	114,2	55,3*	63,6	34	20,1*	1178,2*	2,0	14	48,9	88,4	29

Tabla 1. Continuación

Entrada	Ensayos de campo				Ensayos en condiciones controladas						
	2005 ⁽¹⁾	2006 ⁽¹⁾	Media ⁽²⁾	Clas. ⁽³⁾	rTML (%) ⁽⁴⁾	Hoja cortada			Planta completa		
						AUDPC ⁽⁵⁾	m ⁽⁶⁾	Clas. ⁽⁷⁾	rS (%) ⁽⁸⁾	AUDPC ⁽⁹⁾	Clas. ⁽¹⁰⁾
BG 924	54,8	65,3*	63,8	35	49,2*	2282,7*	3,2	33	40,8*	65,8*	25
Protabón	69,6	63,4*	64,3	36	52,8	2471,7	3,5	34	21,9*	45,2*	14
544	49,9	70,1*	67,2	37	29,9*	1494,3*	2,0	20	87,0	162,5	37
1646	92,9	73,8*	76,5	38	36,7*	1784,5*	2,7	26	93,3	190,9	40
Disco	122,1	92,0*	96,3	39	15,7*	946,5*	1,7	11	64,2	124,4	31
Baraka	88,3	98,3	96,9	40	35,6*	1807,8*	2,5	24	65,4	118,7	32
ILB 365	100,0	100,0	100,0	41	100,0	4491,9	4,4	40	100,0	173,6	41
BG 1251⁽²⁰⁾					44,3*	2168,7	2,8		33,3	65,2	

⁽¹⁾ AUDPC relativa de los valores de severidad, expresado como el porcentaje del valor alcanzado por el testigo susceptible ILB 365 (255 en el año 2005, 1544,83 en el año 2006); ⁽²⁾ media de los valores de AUDPC relativo en los dos ensayos de campo, expresado como el porcentaje del valor medio alcanzado por el testigo susceptible ILB 365 (904,92); ⁽³⁾ clasificación de las entradas según los valores medios de AUDPC relativa; ⁽⁴⁾ tamaño medio de lesión relativo (TML), expresado como el porcentaje del valor alcanzado por el testigo susceptible ILB 365 (68,24); ⁽⁵⁾ AUDPC de los valores de TML; ⁽⁶⁾ índice de crecimiento de lesión en mm día⁻¹; ⁽⁷⁾ clasificación de las entradas según los valores de TML; ⁽⁸⁾ severidad relativa, expresada como el porcentaje del valor alcanzado por el testigo susceptible ILB 365 (2749, 56); ⁽⁹⁾ AUDPC de los valores de severidad; ⁽¹⁰⁾ clasificación de las entradas según los valores de severidad.

Nombres completos de aquellas entradas cuyos nombres se muestran abreviados: ⁽¹¹⁾ Sel.97 Lat.97 135-1; ⁽¹²⁾ Sel.97 Lat.97 174-1; ⁽¹³⁾ Sel.97 Lat.97 132-1; ⁽¹⁴⁾ Sel.97 Lat.97 132-3; ⁽¹⁵⁾ Sel.97 Lat.97 158-1; ⁽¹⁶⁾ Sel.97 Lat.97 152-1; ⁽¹⁷⁾ Sel.97 Lat.97 095-3; ⁽¹⁸⁾ Sel.97 Lat.97 097-2; ⁽¹⁹⁾ Sel.97 Lat.97 095-1.

⁽²⁰⁾ la entrada BG 1251 no fue evaluada en los ensayos de campo; no se ha incluido en las clasificaciones de las entradas de ninguno de los tres experimentos.

* significativamente diferente del valor del testigo susceptible ILB 365 (test de Dunnet con p = 0,05), empleando datos transformados mediante la expresión $\arcsin \sqrt{x}$

Ensayo en planta completa

El análisis de varianza para la severidad total de cada planta a las 96 horas tras la inoculación, con entrada como factor fijo, mostraron diferencias significativas entre las entradas ($p < 0,0001$). En la Tabla 1 se presentan los resultados de cada entrada: el valor más bajo fue el de ILB 4723 (5,98%), mientras que el más alto lo alcanzó el testigo susceptible ILB 365 (68,24%).

Con el objetivo de averiguar si la edad de la hoja tiene influencia en el tamaño de la lesión, se llevó a cabo un análisis de varianza de la severidad, en el que los factores eran “mitad de planta” (según se ha definido en Materiales y Métodos) y entrada. Los resultados mostraron interacciones significativas para entrada, mitad y la interacción entrada x mitad ($p < 0,0001$ para las tres fuentes de variación). La existencia de una interacción entrada x mitad nos llevó a realizar un ANOVA individual para cada línea, para averiguar cuáles eran las entradas que presentaban diferencias significativas entre sus mitades (siendo “mitad” el factor fijo). Para estos análisis el valor de cada mitad se expresó como la proporción entre la severidad de cada mitad y la severidad del conjunto de la planta. Las significaciones de estos análisis se encuentran en la Tabla 2. El número de entradas que no presentan diferencias significativas entre mitades es de 19 (del total de 42 evaluadas). Además, buscando una posible relación entre la influencia de la edad de la hoja y la severidad de cada entrada, se llevó a cabo un análisis de varianza adicional: el factor fijo “influencia de la edad de la hoja” se definió consiguientemente como la existencia o no de diferencias entre las mitades de la planta, por tanto, con sólo dos niveles: *sí* y *no*. Se detectaron diferencias significativas ($p = 0,0008$) para dicho factor; el análisis LSD mostró que la severidad media en aquellas entradas en las que existe diferencia entre mitades es mayor que en aquéllas en las que dicha diferencia no se da (Tabla 3). Esta diferencia entre mitades estuvo presente en todas las entradas con una severidad mayor que 40%, salvo una. Cuando el análisis de varianza se repitió pero sólo para las entradas cuya severidad fue menor de 40%, no se encontró

Tabla 2. Clasificación de las entradas evaluadas mediante el ensayo en planta completa, según exista o no un efecto significativo ($p < 0,05$) de la edad de la hoja en sus respuestas a la infección de *B. fabae*.

Significativo	No significativo
095-3 ⁽¹⁾	095-1 ⁽⁵⁾
132-1 ⁽²⁾	097-2 ⁽⁶⁾
132-3 ⁽³⁾	152-1 ⁽⁷⁾
135-1 ⁽⁴⁾	158-1 ⁽⁸⁾
144	174-1 ⁽⁹⁾
1646	1809
1647	237
324	BG 1093
441	BG 1250
544	BG 1261
898	BG 924
BARAKA	BG 977
BG 1095	BPL 1763
BG 1222	BPL 710
BG 1251	BROCAL
BG 257	ILB 4723
BPL 261	LPF 05
DISCO	LPF 39
ILB 365	PROTABON
ILB 4709	
ILB 5284	
LPF 120	
LPF 95	

Nombres completos de aquellas entradas cuyos nombres se muestran abreviados: ⁽¹⁾ Sel.97 Lat.97 095-3; ⁽²⁾ Sel.97 Lat.97 132-1; ⁽³⁾ Sel.97 Lat.97 132-3; ⁽⁴⁾ Sel.97 Lat.97 135-1; ⁽⁵⁾ Sel.97 Lat.97 095-1; ⁽⁶⁾ Sel.97 Lat.97 097-2; ⁽⁷⁾ Sel.97 Lat.97 152-1; ⁽⁸⁾ Sel.97 Lat.97 158-1; ⁽⁹⁾ Sel.97 Lat.97 174-1.

ninguna diferencia significativa (datos no mostrados). En la Figura 3 se puede observar esta distribución de las entradas según su severidad y la existencia o no de la influencia de la edad de las hojas.

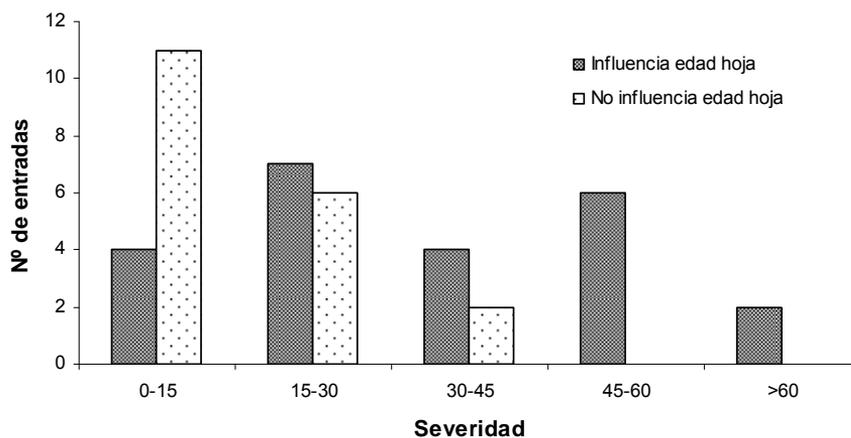
El análisis de varianza para el daño en tallos no mostró diferencias significativas entre entadas (datos no mostrados). Cuando se compararon los

resultados con los de la severidad en hojas mediante el análisis de correlación de Pearson, no se encontró correlación significativa (datos no mostrados).

Tabla 3. Severidades medias de las entradas según exista influencia de la edad de la hoja o no (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión \sqrt{x} ; $p < 0,05$).

	Severidad
Influencia edad hoja	35,4 a
No influencia edad hoja	16,6 b

Figura 3. Distribución de las 42 entradas evaluadas en el ensayo de planta completa por rangos de severidad, según muestren o no influencia de la edad de la hoja en la respuesta a la infección.



Comparación de los métodos de evaluación

En la Tabla 4 se presentan los valores de las correlaciones de Pearson entre los resultados de todos los experimentos. Puede verse que existe una correlación positiva y significativa en todos los casos. Cuando los ensayos de laboratorio en condiciones controladas se comparan con la media de los ensayos de campo, el valor para el ensayo en planta completa es mayor que para el ensayo en hoja cortada: 0,60 (severidad final) y 0,38 (tamaño medio de lesión final), respectivamente. El empleo de los valores de AUDPC para los ensayos de laboratorio en condiciones controladas en vez de los de las evaluaciones finales (severidad final y tamaño medio de lesión final) no supuso mejora de los coeficientes de correlación con los ensayos de campo; el índice de crecimiento de la lesión tampoco mejoró dicho coeficiente.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson para los diferentes parámetros de evaluación empleados en los experimentos de laboratorio y en los ensayos de campo (AUDPC-Cmp.: media de los valores de AUDPC de ambos ensayos de campo; EPC: ensayo en planta completa; EHC: ensayo en hoja cortada; S: severidad final; TML: tamaño medio de lesión final; m: índice de crecimiento de lesión).

	S-EPC	AUDPC-EPC	TML-EHC	AUDPC-EHC	m-EHC
AUDPC-Cmp.	0,60***	0,57***	0,37*	0,38*	0,36*
S-EPC			0,37*	0,35*	0,36*
AUDPC-EPC			0,37*	0,36*	0,38*

*** y * indican efectos significativos a 0,0001 y 0,05 niveles de probabilidad, respectivamente

Influencia de la edad de la planta y de la temperatura

El análisis de varianza factorial para severidad puso de manifiesto diferencias significativas para genotipo, temperatura, y para la interacción edad x temperatura (Tabla 5). Ya que no se encontró ninguna interacción entre genotipo y cualquier otro factor, los genotipos evaluados se pueden comparar por sus valores medios para todas las edades de planta y temperaturas. Por tanto, las medias de las diferentes entradas han sido separadas mediante una

prueba LSD (Tabla 6). Estos valores reflejan bien los resultados alcanzados por estas líneas en el ensayo previo en planta completa. En aquel ensayo, este grupo de 7 genotipos mostraron alta correlación con los ensayos de campo ($r = 0,92$; $p < 0,01$). En este caso los resultados del ensayo para edad de la planta y temperatura muestran buena correlación tanto con el ensayo en planta completa ($r = 0,84$; $p < 0,05$), como con el ensayo de campo ($r = 0,85$; $p < 0,05$).

Tabla 5. Análisis de varianza de los efectos de genotipo, edad y temperatura en la severidad de 7 entradas evaluadas en ensayo en planta completa (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Repetición	3	209,77	69,92
Genotipo	6	3529,93	588,32***
Edad	1	0,89	0,89
Temperatura	2	6022,55	3011,27***
Genotipo x Edad	6	591,27	98,54
Genotipo x Temperatura	12	1774,73	147,89
Edad x Temperatura	2	912,48	456,24*
Genotipo x Edad x Temperatura	12	999,17	83,26
Error	71	5973,01	84,13
Total	115	20013,80	

*** y * indican efectos significativos a 0,0001 y 0,01 niveles de probabilidad, respectivamente

También se llevó a cabo una prueba LSD para estudiar la interacción edad x temperatura (Tabla 7). La severidad media es mayor en las plantas jóvenes que en las adultas a 20 °C, mientras que lo contrario sucede a 25 °C; a 13 °C no hay diferencias entre edades, siendo los valores de severidad los más bajos de todos los casos.

Con la intención de comprobar el posible efecto de la edad de la hoja en el experimento, otro análisis factorial de varianza se llevó a cabo, añadiendo el factor “mitad de planta” a los anteriormente analizados. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los términos de interés en este caso son aquellos en los

Tabla 6. Severidades medias de las entradas evaluadas en el experimento sobre influencia de la edad de la planta y la temperatura. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión $\arcsen \sqrt{x}$; $p < 0,05$).

Entrada	Severidad
544	24,9 a
ILB 365	19,6 a
324	13,8 ab
237	9,2 bc
1809	7,7 cd
ILB 4709	4,1 cd
BPL 710	2,7 d

Tabla 7. Severidades medias de las diferentes combinaciones de edad de planta y temperatura evaluadas en el experimento de influencia de la edad de la planta y la temperatura. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión $\arcsen \sqrt{x}$; $p < 0,05$).

Temperatura	Edad de planta	
	Jóvenes	Adultas
13	1,17 d	1,92 d
20	22,63 a	12,34 bc
25	12,15 c	20,49 ab

que aparece el factor mitad. Se encontraron diferencias significativas para mitad, genotipo x mitad, mitad x edad, mitad x temperatura y mitad x edad x temperatura. A partir de estos resultados, se realizó una prueba LSD para la interacción mitad x edad x temperatura (Tabla 9). Se observa que a 20 °C la severidad de las hojas antiguas es mayor que la de las nuevas tanto en las plantas jóvenes como para las adultas; a 25 °C sucede igual en las plantas adultas, mientras que en el caso de las jóvenes no hay diferencias entre hojas antiguas y nuevas; finalmente, a 13 °C no hay diferencias de severidad entre hojas antiguas y nuevas ni en plantas adultas ni en jóvenes.

Tabla 8. Análisis de varianza de los efectos de genotipo, mitad, edad y temperatura en la severidad de las 7 entradas evaluadas en el experimento sobre la influencia de la edad de la planta y la temperatura. Sólo se muestran aquellas interacciones en las que el término mitad está presente (GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; T: temperatura).

Fuente	GL	SC	CM
Repetición	3	448,1	149,36
Edad	1	201,0	200,97
Genotipo	6	9922,0	1653,67***
Mitad	1	3344,4	3344,41***
T	2	16814,2	8407,09***
Edad x Genotipo	6	1313,7	218,96
Edad x Mitad	1	1131,8	1131,84**
Edad x T	2	628,9	314,47
Genotipo x Mitad	6	2638,2	439,70**
Genotipo x T	12	4646,4	387,20**
Mitad x T	2	1327,0	663,48**
Edad x Genotipo x Mitad	6	1003,6	167,27
Edad x Genotipo x T	12	1737,0	44,75
Edad x Mitad x T	2	751,8	375,92*
Genotipo x Mitad x T	12	1443,2	120,27
Edad x Genotipo x Mitad x T	12	1214,5	101,21
Error	147	17064,5	116,08
Total	233		

***, ** y * indican efectos significativos a 0,0001, 0,001 y 0,01 niveles de probabilidad, respectivamente

Discusión

La identificación de los genotipos apropiados es un paso fundamental para la mejora por resistencia a enfermedades. Lo deseable es que dicha identificación se realice en el tiempo más corto posible, pero asimismo con suficiente precisión como para asegurar que el material seleccionado sea el mejor para nuestros objetivos; el disponer de buenos métodos de evaluación es por tanto esencial para esta tarea. Sin embargo, el proceso de mejora incluye otras estrategias como el estudio de los diferentes factores que pueden influir

Tabla 9. Severidades medias de las diferentes combinaciones de edad de planta, mitad de planta (para edad de hoja) y temperatura evaluadas en el experimento de influencia de la edad de la planta y la temperatura. Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión \sqrt{x} ; $p < 0,05$).

Temperatura	Edad hojas	Edad de planta	
		Jóvenes	Adultas
13	Antiguas	1.17 d	3.40 d
	Nuevas	1.20 d	0.95 d
20	Antiguas	26.92 a	30.27 a
	Nuevas	15.55 b	9.56 bc
25	Antiguas	13.36 bc	34.11 a
	Nuevas	10.81 bc	6.97 c

sobre la interacción huésped-patógeno y, consiguientemente, afectar la respuesta de resistencia. El conocimiento de estas influencias se considera clave para garantizar la estabilidad de la resistencia a largo plazo.

Esos son los criterios que hemos seguido para este trabajo. En primer lugar quisimos identificar el mejor método para evaluar el material vegetal contra botritis en condiciones controladas en el laboratorio y emplearlo para la selección de entradas resistentes a la enfermedad. En segundo lugar, buscamos determinar la posible influencia de la edad del tejido (edades de hoja y de planta) y de la temperatura en el sistema patogénico *V. faba / B. fabae*.

Comparación de los métodos de evaluación y selección de fuentes de resistencia

Cuando los ensayos de laboratorio se compararon con la media de los resultados de los ensayos de campo, el coeficiente de correlación para el ensayo en planta completa fue mayor (0,60) que el de el ensayo en hoja cortada (0,37). Esto era de esperar, ya que es la respuesta de todo el sistema de la planta la que

es evaluada, y no sólo la de hojas aisladas. Además, el método de inoculación es más parecido al modo en que la infección tiene lugar en la naturaleza. Los resultados, pues, arrojan serias dudas sobre el método de hoja cortada para evaluar las respuestas de las habas a botritis. Aunque ha sido ampliamente utilizado (Hanounik and Robertson, 1988; Cole et al., 1996; Bouhassan et al., 2003; Bouhassan et al., 2004a; Staats et al., 2007), por lo que sabemos sólo Bouhassan et al. (2004) habían llevado a cabo con anterioridad un estudio sobre la correlación de los resultados del ensayo de hoja cortada con los de los ensayos de campo. En ese trabajo, diferentes componentes de resistencia fueron evaluados en un ensayo de hoja cortada, y los resultados correlacionados con el valor de la AUDPC del índice de enfermedad de un ensayo de campo. Los coeficientes de correlación variaron entre 0,26 y 0,32. Nuestros resultados confirman esta baja correspondencia entre ambos tipos de ensayos, y no apoyan la suposición de que los ensayos de hoja cortada son más coherentes con los ensayos de campo en el caso de los genotipos altamente susceptibles y altamente resistentes, y que las discrepancias sólo se dan en aquellos que muestran reacciones intermedias a la enfermedad (Bouhassan et al., 2004a). En nuestra opinión, pues, el ensayo en planta completa debería usarse en lugar del de hoja cortada siempre que fuese posible.

Los resultados de la evaluación en los tallos han mostrado que no existe relación entre el daño en los tallos y el que se produce en las hojas, como ya había sido previamente apuntado (Rhaïem et al., 2002). Por tanto, el valor de severidad en hojas debería prevalecer a la hora de seleccionar el material, salvo en el caso de tallos muy susceptibles que pudiesen comprometer a la planta en su conjunto, y por tanto afectar al rendimiento, algo que nosotros no hemos encontrado.

Seis entradas se encuentran entre las diez mejores posiciones, tanto en la media de los resultados de campo como en el ensayo de planta completa (132-1, 135-1, 174-1, BPL 710, ILB 4726, ILB 5284). Pueden, pues, ser

propuestas como fuentes de resistencia prometedoras para esta zona de España. Sólo cuatro de ellas (132-1, 135-1, BPL 710, ILB 4726) habían sido incluidas entre el grupo de diez entradas identificadas como fuentes de resistencia interesantes en el ensayo en múltiples ambientes que hemos expuesto en el capítulo anterior. De este modo, se puede concluir que el ensayo en planta completa ha permitido afinar ese proceso previo de selección, y escoger aquellas entradas que son más idóneas para el ambiente concreto de Córdoba. Además nos ha permitido identificar dos nuevas fuentes de resistencia para esta zona que habríamos pasado por alto.

Influencia de la edad de la hoja, de la planta y de la temperatura

Se ha publicado que la edad del tejido del huésped puede afectar al desarrollo de la enfermedad en muchos sistemas patogénicos (Panter and Jones, 2002). En nuestro trabajo nos centramos primero en el efecto de la edad de la hoja tanto en el ensayo en planta completa como en el de hoja cortada. Según varios estudios, en una misma planta las hojas más jóvenes son menos susceptibles a la infección de *B. fabae* que las más viejas (Harrison, 1988; Heilbronn and Harrison, 1989; Bouhassan et al., 2004b). Esto también sucede con otros sistemas patogénicos: patata / *Phytophthora infestans* (Visker et al., 2003), patata / *Alternaria solani* (Rodríguez et al., 2006), taro / *Phytophthora colocasiae* (Brooks, 2008), o perejil / *Septoria petroselini* (Kurt and Tok, 2006). Sin embargo, nuestros resultados, obtenidos sobre un número de entradas mucho mayor que las empleadas en los estudios previos sobre botritis antes citados, muestran que esta influencia de la edad de la hoja depende del genotipo, ya que la mayor susceptibilidad de las hojas más viejas no está presente en un número importante de las entradas evaluadas. La relación que parece haber entre la severidad de la enfermedad y la influencia de la edad de las hojas es muy llamativa: en las entradas con los mayores valores de severidad, las hojas de más edad mostraron más susceptibilidad a botritis, mientras que en el resto de las entradas la respuesta fue más variada. Esto

podría sugerir que las hojas más jóvenes de *V. faba* presentan constitutivamente más resistencia a la infección por *B. fabae* que las hojas más viejas; cuando se superponen mecanismos adicionales de resistencia, este efecto de la edad puede quedar enmascarado o no, dando lugar a la diversidad de reacciones que hemos encontrado. En cualquier caso, esto es sólo una hipótesis, y los mecanismos que subyacen a estas diferentes reacciones deberían ser investigados en profundidad en el futuro, ya que un conocimiento más amplio de estos procesos sería de gran valor a la hora de comprender la compleja interacción entre la planta y el patógeno.

Ya que no pudimos estudiar la influencia de la edad de la planta en la colección completa, seleccionamos 7 entradas con ese propósito. El efecto de la temperatura se estudió a la vez en el mismo experimento para detectar, si la hubiere, alguna relación con la edad de la planta, como en el caso de la resistencia de planta adulta a alta temperatura a la roya amarilla del trigo (Qayoum and Line, 1985). Los resultados de este experimento muestran que no hay interacción del factor genotipo ni con la edad de la planta ni con la temperatura, de modo que la respuesta diferencial de los genotipos es independiente de estos dos factores. Esto es de gran importancia, especialmente en el caso de las entradas resistentes. La estabilidad de la resistencia es una cuestión de gran importancia en la mejora e, idealmente, no debería cambiar ni con la edad ni con las condiciones ambientales. Aunque obviamente estos resultados no pueden generalizarse para cada todos los posibles genotipos, es significativo que estas siete entradas, tan diferentes entre ellas, muestren el mismo comportamiento independientemente de la edad de la planta o de la temperatura. Se conocen casos de genotipos resistentes que se vuelven susceptibles con la edad, como en el sistema garbanzo / *Ascochyta rabiei* (Basandrai et al., 2007), y también casos en los que sucede lo contrario, por ejemplo, en repollo / *Hyaloperonospora parasitica* (Coelho et al., 2009). Asimismo, hay ejemplos de genes responsables de resistencias que se ven influidos por la temperatura (Skinner and Stuteville, 1989; Wang et al., 2009)

En *V. faba* se ha encontrado que la resistencia a *Uromyces viciae-fabae* no depende de la edad de la planta, mientras que el incremento de temperatura sí induce resistencia en algunos genotipos (Sillero et al., 2000). Con respecto a habas / *B. fabae*, por lo que sabemos, sólo se han llevado a cabo dos estudios relativos a la relación entre resistencia y edad de la planta (Bouhassan et al., 2004b) o temperatura (Bouhassan et al., 2007). Estos trabajos se ejecutaron mediante ensayos en hoja cortada, así que sus resultados se deben tomar con ciertas reservas. En el primer artículo no se encontró ninguna interacción entre la edad de la planta y el genotipo, como en nuestro trabajo (estudiaron tres edades de planta: 4 y 7 semanas, como nosotros, y 14 semanas). En el segundo artículo sí se detectó interacción entre temperatura y genotipo, pero no conllevaba influencia de la temperatura sobre la resistencia. Estos autores evaluaron 5 entradas, sólo una en común con nuestro experimento (BPL 710), y esta diferencia en el material vegetal podría explicar la discrepancia en los resultados de los estudios de temperatura. También es posible que las diferencias se expliquen por los diferentes tipos de ensayos empleados, hoja cortada frente a planta completa. En cualquier caso, todos estos trabajos apuntan a la estabilidad de las resistencias estudiadas.

En nuestro trabajo sí detectamos una interacción entre la edad de la planta y temperatura. A 13 °C, la severidad tanto en las plantas adultas como en las jóvenes fue similar y bastante baja, lo que se corresponde con la ralentización de la expansión de las lesiones a temperaturas inferiores a 15 °C que describió Harrison (1988). A 20 °C, la severidad en las plantas jóvenes fue mayor que en las adultas, mientras que a 25 °C sucedía lo contrario. Esto se debe a una disminución de la severidad en las plantas jóvenes a 25 °C, ya que la severidad en las plantas adultas no es significativamente diferente ni a 20 ni a 25 °C. Se podría formular la hipótesis de que las plantas de *V. faba* se vuelven menos susceptibles a botritis a medida que crecen, pero que a 25 °C se desencadenan algunos mecanismos de resistencia que sólo se encuentran presentes en las plantas jóvenes y que no se expresan en las de más edad. Se

sabe que la respuesta a la enfermedad en plantas jóvenes o adultas puede ser controlada por sistemas genéticos diferentes (Coelho et al., 2009), así que éste podría ser también el caso de botritis. Estaríamos, pues, ante un posible caso de resistencia en planta joven a alta temperatura. Esta hipótesis, sin embargo, debería ser investigada adecuadamente. Bouhassan et al. (2004) no encontraron diferencias entre plantas de 4 y 7 semanas, pero en el estadio de llenado de vainas (14 semanas) las plantas resultaron ser menos susceptibles (sus experimentos se realizaron a 15 °C). Aunque su trabajo presenta algunas discrepancias con el nuestro, ambos estudios parecen apuntar a una tendencia hacia menores susceptibilidades a botritis a medida que aumenta la edad de las plantas.

También detectamos en este experimento la interacción entre el efecto de la edad de la hoja y el genotipo. El comportamiento de todas menos una de las entradas fue el mismo que el encontrado en el anterior ensayo de planta completa, lo que confirma la dependencia genotípica de este fenómeno. Esta dependencia queda subrayada por el hecho de que ni la edad de la planta ni la temperatura ha alterado el patrón de influencia de la edad de la hoja en cada entrada en particular. El único caso en el que no se confirmó el resultado del ensayo de planta completa fue en el de la entrada ILB 4709: mientras que en aquel ensayo esta entrada fue incluida entre las que presentaban diferencias entre mitades (es decir, con las hojas más viejas siendo más susceptibles que las más jóvenes), en este experimento no se detectó esa diferencia. Lo cierto es que en el ensayo en planta completa la diferencia entre mitades fue mínima, aunque significativa, por lo que en este caso no podemos establecer ninguna conclusión definitiva.

Finalmente, la interacción mitad x edad x temperatura nos permite una mejor comprensión del fenómeno de menor susceptibilidad de las plantas jóvenes a 25 °C: se debe a una disminución de la susceptibilidad en la mitad inferior de estas plantas, es decir, en las hojas más viejas, en comparación con

lo que sucede con las plantas jóvenes a 20 °C, o con las plantas adultas a cualquier temperatura; estas diferencias no se encuentran en la mitad superior (hojas más jóvenes) en cualquier circunstancia. Así, esto permitiría completar la hipótesis que habíamos formulado más arriba: podría existir algún mecanismo de resistencia en las plantas jóvenes a 25 °C, mecanismo que sólo estaría presente en las hojas más viejas.

En conclusión, este trabajo ha mostrado que el ensayo en planta cortada en condiciones controladas es una herramienta prometedora para estudiar la respuesta de las plantas de *V. faba* a *B. fabae*, resultando de utilidad no sólo para discriminar genotipos, sino también para estudiar diversos aspectos de la enfermedad. La mayor susceptibilidad de las hojas más viejas en comparación con las más jóvenes no es un fenómeno generalizado, sino que depende del genotipo. La respuesta global de los genotipos no parece estar influida ni por la edad de la planta ni por la temperatura, aunque la temperatura sí afecta de modo diferencial a las reacciones de las plantas adultas y las jóvenes. Asimismo, se seleccionaron seis entradas como fuentes de resistencia de interés para programas de mejora en el sur de España. El trabajo futuro debería centrarse, por un lado, en incorporar las mejores fuentes de resistencia en fondos genéticos de interés comercial y, por otro, en investigar más a fondo los mecanismos que subyacen a los efectos de la edad de la hoja y de las interacciones entre edad de la planta y temperatura.

Bibliografía

- Basandrai, A.K., Basandrai, D., Pande, S., Sharma, M., Thakur, S.K., Thakur, H.L., 2007. Development of ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea as affected by host resistance and plant age. *European Journal of Plant Pathology* 119, 77-86.
- Berger, R.D., Bergamin, A., Amorim, L., 1997. Lesion expansion as an epidemic component. *Phytopathology* 87, 1005-1013.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., 2004a. Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica* 135, 55-62.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., 2007. Effets de la temperature et de la dose de l'inoculum sur les composantes de la résistance partielle de la fève au *Botrytis fabae* Sard. *Acta Botanica Gallica* 154, 53-62.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Khiati, N.E., 2003. Analysis by detached leaf assay of components of partial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard. *Phytopathologia Mediterranea* 42, 183-190.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Portapuglia, A., 2004b. Influence of growth stage and leaf age on expression of the components or partial resistance of faba bean to *Botrytis fabae* Sard. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 318-324.
- Brooks, F.E., 2008. Detached-leaf bioassay for evaluating taro resistance to *Phytophthora colocasiae*. *Plant Disease* 92, 126-131.
- Coelho, P.S., Valerio, L., Monteiro, A.A., 2009. Leaf position, leaf age and plant age affect the expression of downy mildew resistance in *Brassica oleracea*. *European Journal of Plant Pathology* 125, 179-188.
- Cole, L., Dewey, F.M., Hawes, C.R., 1996. Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100, 277-286.

- Creighton, N.F., Bainbridge, A., Fitt, B.D.L., 1986. Effects of leaf age, inoculum dose and freezing on development of chocolate spot (*Botrytis fabae*) lesions on field bean (*Vicia faba*) leaves. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 115, 108-115.
- Develey-Riviere, M.P., Galiana, E., 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist* 175, 405-416.
- Deverall, B.J., Wood, R.K.S., 1961. Infection of bean plants (*Vicia faba* L.) with *Botrytis cinerea* and *B. fabae*. *Annals of Applied Biology* 49, 461-472.
- Driscoll, J., Coombs, J., Hammerschmidt, R., Kirk, W., Wanner, L., Douches, D., 2009. Greenhouse and field nursery evaluation for potato common scab tolerance in a tetraploid population. *American Journal of Potato Research* 86, 96-101.
- Foolad, M.R., Ntahimpera, N., Christ, B.J., Lin, G.Y., 2000. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germplasm for early blight resistance. *Plant Disease* 84, 967-972.
- Hanounik, S.B., Robertson, L.D., 1988. New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant Disease* 72, 696-698.
- Harrison, J.G., 1988. The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease - a review. *Plant Pathology* 37, 168-201.
- Heilbronn, J., Harrison, J.G., 1989. Effects of bean leaf age on pathogenicity by *Botrytis fabae*. *Journal of Phytopathology* 126, 272-278.
- Hutson, R.A., Mansfield, J.W., 1980. A genetical approach to the analysis of mechanisms of pathogenicity in *Botrytis/Vicia faba* interactions. *Physiological Plant Pathology* 17, 309-317.
- Kim, H.S., Hartman, G.L., Manandhar, J.B., Graef, G.L., Steadman, J.R., Diers, B.W., 2000. Reaction of soybean cultivars to sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science* 40, 665-669.

- Kuntze, L., Fuchs, E., Gruntzig, M., Schulz, B., Klein, D., Melchinger, A.E., 1997. Resistance of early-maturing European maize germplasm to sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Plant Breeding* 116, 499-501.
- Kurt, S., Tok, F.M., 2006. Influence of inoculum concentration, leaf age, temperature, and duration of leaf wetness on *Septoria* blight of parsley. *Crop Protection* 25, 556-561.
- Panter, S.N., Jones, D.A., 2002. Age-related resistance to plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, Vol 38 38, 251-280.
- Qayoum, A., Line, R.F., 1985. High-temperature, adult-plant resistance to stripe rust of wheat. *Phytopathology* 75, 1121-1125.
- Rhaïem, A., Cherif, M., Kharrat, M., Cherif, M., Harrabi, M., 2002. New faba bean genotypes resistant to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 99-108.
- Ricard, T.S., Johnston, W.J., 2005. Correlating field and controlled-environment studies of pink snow mold resistance in Pacific Northwest, USA, Greens-type *Poa annua*. *Research Journal of the International Turfgrass Society* 10, 206-212.
- Rodriguez, M.A.D., Brommonschenkel, S.H., Matsuoka, K., Mizubuti, E.S.G., 2006. Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. *Journal of Phytopathology* 154, 230-235.
- Sillero, J.C., Moreno, M.T., Rubiales, D., 2000. Characterization of new sources of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba*. *Plant Pathology* 49, 389-395.
- Skinner, D.Z., Stuteville, D.L., 1989. Influence of temperature on expression of resistance to rust in diploid alfalfa. *Crop Science* 29, 675-677.
- Smith, J.D., Kidwell, K.K., Evans, M.A., Cook, R.J., Smiley, R.W., 2003. Assessment of spring wheat genotypes for disease reaction to *Rhizoctonia solani* AG-8 in controlled environment and direct-seeded field evaluations. *Crop Science* 43, 694-700.

- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J.A.L., Bakker, F.T., 2007. Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology* 44, 52-63.
- Tahi, G.M., Kebe, B.I., Sangare, A., Mondeil, F., Cilas, C., Eskes, A.B., 2006. Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. *Plant Pathology* 55, 776-782.
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W.D., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223-253.
- Tivoli, B., Berthelem, D., Le Guen, J., Onfroy, C., 1986. Comparison of some methods for evaluation of reaction of different winter faba bean genotypes to *Botrytis fabae*. *FABIS Newsletter* 16, 46-51.
- Twizeyimana, M., Ojiambo, P.S., Ikotun, T., Hartman, G.L., Bandyopadhyay, R., 2007. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease* 91, 1161-1169.
- Visker, M., Keizer, L.C.P., Budding, D.J., Van Loon, L.C., Colon, L.T., Struik, P.C., 2003. Leaf position prevails over plant age and leaf age in reflecting resistance to late blight in potato. *Phytopathology* 93, 666-674.
- Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., Hua, J., 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 498-506.
- Yan, W., 2002. Singular-value partitioning in biplot analysis of multi-environment trial data. *Agronomy Journal* 94, 990-996.

Capítulo III

Caracterización a nivel microscópico de la resistencia de *Vicia faba* a *Botrytis fabae*

Introducción

La identificación de material vegetal que presente resistencia genética a patógenos es fundamental para llevar a cabo la mejora por resistencia a enfermedades. Sin embargo, el proceso de mejora no debería limitarse al empleo de este material para la obtención de nuevas variedades, sino que sería conveniente conocer la naturaleza de la resistencia utilizada, ya que las plantas disponen de múltiples mecanismos de resistencia con los que hacer frente a los estreses bióticos. La caracterización de los diferentes tipos de resistencia disponibles ayuda a la correcta orientación de los programas de mejora, de modo que los genes se puedan combinar del modo más adecuado a cada situación.

La caracterización de la resistencia se puede llevar a cabo tanto a nivel macroscópico como microscópico. A nivel macroscópico incluye la determinación de una serie de parámetros que varían según la enfermedad en cuestión, y que constituyen los llamados componentes macroscópicos de resistencia. A nivel microscópico se intenta establecer mediante estudios histológicos en qué momento del proceso de infección se desencadenan los mecanismos de resistencia, y qué efectos tienen éstos sobre el patógeno. Existen varios ejemplos de caracterización de la resistencia a diferentes enfermedades en leguminosas (Sillero et al., 2006; Tivoli et al., 2006).

Por lo que se refiere a la botritis, algunos de los componentes macroscópicos de resistencia usados ya han sido vistos en el capítulo anterior, como la severidad o el índice de crecimiento de las lesiones; hemos hecho también mención a estudios en los que se han empleado otros componentes (Bouhassan et al., 2003; Bouhassan et al., 2004), por ejemplo el período de incubación (tiempo hasta que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad) o el período de latencia (tiempo hasta que se produce la esporulación, o sea, hasta que se desarrollan los conidióforos). Sin embargo, no existe hasta la fecha

ningún trabajo en el que se haya caracterizado a nivel microscópico dicha resistencia. Sí se ha estudiado, por el contrario, el proceso de infección de *Botrytis fabae* a nivel histológico, describiendo la evolución del hongo tanto en pre- como en post-penetración, pero siempre en genotipos susceptibles a la enfermedad. Estos estudios se han llevado a cabo fundamentalmente mediante microscopía electrónica, aunque también se ha hecho uso de la inmunofluorescencia indirecta (Mansfield y Richardson, 1981; Cole et al., 1996; Cole et al., 1998a; Cole et al., 1998b).

La inmunofluorescencia indirecta requiere la utilización de dos anticuerpos. El llamado anticuerpo primario actúa contra el antígeno objetivo en un animal como puede ser un ratón o un conejo. El anticuerpo secundario reconoce la región conservada del anticuerpo primario, y está conjugado con un compuesto fluorescente. Se construye, pues, una estructura en tres niveles, con el anticuerpo primario unido sólo a aquellas zonas dónde se encuentra presente el antígeno, y el anticuerpo secundario marcándolas con fluorescencia. En el caso de *B. fabae* se dispone de anticuerpos primarios que lo reconocen, obtenidos contra la matriz extracelular de *B. cinerea* (Bossi y Dewey, 1992).

La microscopía confocal láser es una técnica para la obtención de imágenes de alta resolución de muestras fluorescentes. Con microscopía óptica normal, la mayor parte de la fluorescencia observada está fuera de foco (ya que proviene de diferentes planos de la muestra). La microscopía confocal permite obtener la luz solamente de la parte de la muestra que se encuentra en el plano focal del objetivo del microscopio. El láser ilumina sólo un área pequeña cada vez, escaneando la muestra entera. Se pueden tomar diferentes secciones ópticas, con lo que, al final, se dispone de una imagen nítida en profundidad, no exclusivamente plana; es posible, además, la reconstrucción de imágenes en tres dimensiones a partir de las secciones ópticas, de modo que se pueden visualizar mejor las estructuras de interés (Ruzin, 1999; Genre, 2008). La aplicación de esta técnica a la interacción *V. faba* / *B. fabae* resultaría de gran interés, pues

facilitaría un estudio más detallado de la misma, aplicación de la que no tenemos conocimiento se haya realizado hasta la fecha.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Poner a punto protocolos de microscopía para el estudio a nivel histológico de la infección de *B. fabae* en *V. faba*.
- Caracterizar microscópicamente la resistencia a *B. fabae* de un genotipo de *V. faba*.

Material y métodos

Se llevaron a cabo dos experimentos: uno para caracterizar histológicamente el proceso de infección en un genotipo resistente y otro susceptible, y otro para estudiar la germinación de las esporas de *B. fabae* sobre ambos genotipos. En los dos experimentos se realizó también una evaluación de la respuesta de los genotipos a la infección.

Caracterización histológica de la infección

Material vegetal

Se emplearon la entrada BPL 710, descrita como resistente en trabajos previos (Sillero et al., 2010) y la entrada susceptible Rebayá 40. Los comportamientos de ambas entradas han sido confirmados por nosotros tanto en campo como en condiciones controladas, como se ha visto en los capítulos anteriores.

Se sembró una semilla de cada entrada en una maceta de plástico de un litro de volumen llena con una mezcla de arena y turba (1:1, v:v), con 5 repeticiones para BPL 710 y 4 repeticiones para Rebayá 40, siendo cada maceta

una repetición (el diferente número de repeticiones entre genotipos se debió a diferencias de germinación entre ambos). Las macetas se colocaron en un incubador en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y luz visible (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ de intensidad de luz), con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

Material patológico

Se utilizó un aislado monospórico de *B. fabae* procedente de Túnez (IBf24). Se sembró en placas Petri (9 cm de diámetro) con medio PDA (patata, dextrosa, agar) y creció en un incubador con una temperatura de 19 °C y un ciclo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz (visible + ultravioleta cercano), empezando en oscuridad. Las placas estaban cubiertas de una densa capa de conidióforos 12 días después.

Inoculación

Cuando las plantas tenían 5 hojas (2 semanas después de la siembra), se cortaron los dos folíolos de la tercera hoja de cada planta y cada uno de ellos se colocó sobre una placa Petri (9 cm. de diámetro) con agar-agua (0,4% p/v).

Se preparó una suspensión de esporas en medio líquido a partir de los cultivos de *B. fabae* en PDA. Se vertió una solución de glucosa (1,2% p/v) en cada placa (10 - 15 ml por placa), y se liberaron las esporas haciendo pasar por la superficie de la misma un asa de siembra. Esta suspensión se filtró a través de una malla de nylon (200 micras de paso) para eliminar restos de micelio. La concentración de esporas se calculó con un hematocímetro, y se diluyó con la solución de glucosa hasta alcanzar una concentración de esporas de 80.000 esporas/ml. Finalmente, se añadió Tween-20 a la suspensión (0,03% v/v), para facilitar la retención de la solución sobre la superficie de la hoja.

La inoculación se realizó depositando dos gotas de 5 μl de la suspensión de esporas en cada folíolo. Las placas que contenían los folíolos se

situaron en el interior de una cámara de flujo laminar en funcionamiento, con el fin de secar la gota. Una vez seca, las placas se cubrieron con sus tapas y se trasladaron al incubador en el que había crecido el hongo, manteniendo las mismas condiciones (comenzando con el período de oscuridad).

Preparación de las muestras

Tras probar en ensayos previos diferentes protocolos de montaje y tinción para la observación de muestras en el microscopio, se optó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los otros procedimientos probados fueron la tinción con azul tripán (según Sillero y Rubiales [2002]), tinción con azul de anilina (descrita por Hood y Shew [1996]) y la tinción con Uvitex 2B (según Rohringer et al. [1977]), con diferentes modificaciones de los protocolos publicados.

Para el protocolo de inmunofluorescencia se procedió del siguiente modo. A las 24 horas de la inoculación se sacaron las placas del incubador. A los foliolos se les quitó a la epidermis del envés y con un sacabocados se les cortaron discos de 5 mm de diámetro tomando como centro de los mismos el lugar en el que se había depositado la gota con el inóculo. Estos discos se sumergieron en una solución de paraformaldehído en PBS (3% p/v) con Tween-20 (0,05%) durante 3 horas, al objeto de fijar los tejidos. Se lavaron 4 veces en PBS (durante 10 minutos cada vez) para eliminar los restos del fijador. La composición del PBS es NaCl (0,8% p/v), KCl (0,02% p/v), Na₂HPO₄ (0,115%), KH₂PO₄ (0,02%) y NaN₃ (0,02%), a pH 6,9. Posteriormente se sumergieron en tampón de bloqueo durante una hora. El tampón de bloqueo es una solución de BSA (albúmina de suero bovino) al 1% (p/v) en PBST (PBS más Tween-20, 0,1% p/v). Nuevamente se procedió a lavar, tres lavados de 10 minutos cada uno, esta vez en PBST. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario durante 2 horas; se empleó el anticuerpo BC-KH4, obtenido en ratón contra la matriz extracelular de *Botrytis cinerea* (Bossi y Dewey, 1992). Luego se volvieron a lavar con PBST (4 lavados de 10 minutos

cada uno), y se incubaron durante una hora en oscuridad con el anticuerpo secundario. Éste es una inmunoglobulina de cabra contra ratón (IgG), conjugada con isotiocianato de fluoresceína, y diluida en el tampón de bloqueo a 1:30 (v/v). Para finalizar, se les dieron otra vez 4 lavados de 10 minutos con PBST. Luego se montaron las muestras en portaobjetos con Citifluor, se colocaron los cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas.

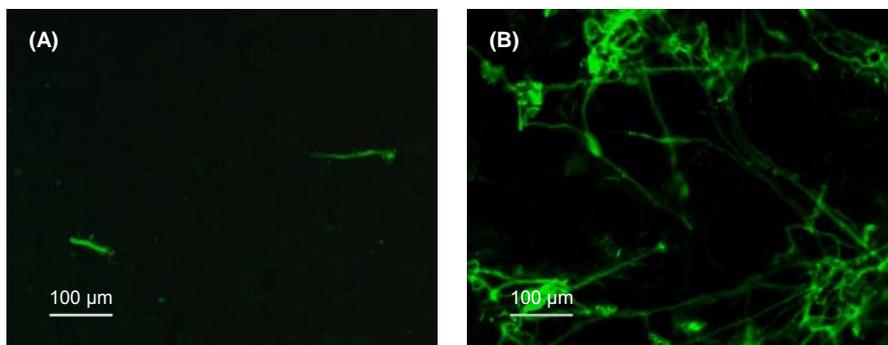
Observaciones y evaluación

Antes de preparar las muestras para inmunofluorescencia, se realizó una evaluación visual de la severidad de la infección. Este parámetro se definió como el porcentaje del área del círculo que abarcaba la gota de inóculo cubierta por lesiones de botritis.

Las observaciones se realizaron con un microscopio Zeiss Axioplan, con un filtro de excitación para epifluorescencia de 450 a 490 nm, y con un microscopio confocal Zeiss de escaneo por láser (longitud de onda del láser de excitación de 488 nm).

Se evaluó el grado de presencia en la superficie de la hoja de micelio del hongo. Para ello se definió la siguiente escala de 1 a 4, donde 1 = presencia de menos de 10 hifas del hongo en cada campo de observación del microscopio a x200 aumentos; 2 = entre 10 y 20 hifas, o presencia de alguna agrupación (entendida ésta como un conjunto denso de hifas que no pueden distinguirse individualmente); 3 = entre 20 y 30 hifas y alguna agrupación; 4 = número elevado de hifas que hace imposible su contabilización, o agrupaciones abundantes (Figura 1).

Figura 1. Ejemplos de los extremos de la escala empleada para evaluar la presencia de *B. fabae* sobre la superficie de las hojas de habas en el ensayo de inmunofluorescencia: (A) valor 1 en la escala; (B) valor 4 en la escala. Las barras horizontales blancas indican la escala en micras.



Estudio de la germinación de *B. fabae*

Material vegetal

Las entradas seleccionadas para este experimento fueron las mismas que para el ensayo de histología, y el material vegetal se manejó del mismo modo. Se contó con 16 plantas del genotipo BPL 710, y 13 de Rebaya 40: 5 repeticiones de BPL 710 y 4 de Rebaya 40 para cada uno de los dos tiempos del estudio de germinación, y 6 repeticiones de BPL 710 y 5 de Rebaya 40 para la evaluación de la respuesta a la infección (una planta por maceta, cada maceta una repetición).

Patógeno

Se usó el mismo aislado monospórico empleado para el ensayo anterior. Los cultivos se obtuvieron como se ha descrito anteriormente.

Inoculación

El procedimiento de inoculación fue el mismo que en el ensayo anterior, con la única diferencia de que sólo se depositó una gota de inóculo (5 µl) en cada foliolo de la hoja cortada.

Preparación de las muestras

El estudio de germinación se realizó para las 6 y las 12 horas tras la inoculación (en plantas diferentes en cada tiempo). El protocolo de tinción fue el descrito por Sillero y Rubiales (2002). Se tomaron los dos foliolos inoculados de cada planta, se cortaron las zonas que incluían los sitios de inoculación y se situaron en placas Petri cuadradas (15 x 15 cm) que contenían pañuelos de papel empapados en solución fijadora (etanol absoluto / ácido acético glacial 1:1 v/v). La solución de fijación se cambió varias veces cada 24 horas, hasta que los tejidos estuvieron totalmente decolorados. Posteriormente se cambiaron los pañuelos por otros empapados en agua, y se mantuvieron las muestras sobre ellos 2 horas para lavar el fijador y ablandar los tejidos. Después, se pusieron sobre otros pañuelos con lactoglicerol (ácido láctico / glicerol / agua, 1:1:1 v/v/v), donde se mantuvieron al menos durante dos horas. Para teñir las muestras se colocó una gota de azul Trypan en lactoglicerol (0,1% p/v) en un cubreobjetos y la muestra se depositó con cuidado sobre el mismo, con el haz hacia el cubreobjetos; luego se montó con lactoglicerol en un portaobjetos.

Observaciones y evaluación

Las muestras se observaron con un microscopio de contraste de fase Leica DM LS de x200 aumentos. Se contaron aproximadamente 100 esporas por cada sitio de inoculación, y se determinó el número de esporas germinadas y no germinadas, calculando el porcentaje de ambas respecto al total.

Asimismo, se evaluó la respuesta a la infección, mediante la determinación del área inoculada cubierta con lesiones de botritis. Para ello, se midió el área del sitio de inoculación y se calculó visualmente el porcentaje de

la misma que presentaba lesiones. Esta evaluación se realizó a las 24 y a las 48 horas tras la inoculación, en plantas diferentes de las empleadas para el estudio de germinación.

Análisis estadístico

Para cada parámetro estudiado se dispuso de un solo valor por planta en todos los ensayos, obtenido al realizar la media de los diferentes valores medidos en esa planta (2 o 4, según el experimento). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para los diferentes parámetros evaluados en los distintos experimentos. Cuando fue necesario, las medias se compararon mediante el test de separación de medias LSD. Se empleó para estos cálculos el programa Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EEUU).

Resultados

Caracterización histológica de la infección

Los protocolos con azul tripán, azul de anilina y Uvitex 2B no permitieron la observación del hongo tras la penetración, es decir, en el interior del tejido vegetal, tiñéndose sólo el micelio que se encontraba en la superficie de la hoja. Con la técnica de inmunofluorescencia, sin embargo, sí se consiguió observar el hongo tanto en pre- como en post-penetración, obteniendo así una visión completa del proceso de infección. Tras la germinación de las esporas, las hifas recorren una distancia variable sobre la superficie de la hoja antes de penetrar en la misma. La penetración se hace directamente a través de la epidermis; las hifas suelen engrosarse, y es frecuente ver alta densidad de matriz extracelular en el sitio de penetración. En el punto en el que se atraviesa la epidermis tiene lugar un estrechamiento de la hifa, pudiendo observarse un anillo denso de matriz extracelular, para recuperar su grosor normal en el interior del tejido vegetal. Una vez en el mismo, las hifas siguen creciendo,

extendiéndose, ramificándose y provocando el colapso y la muerte de las células de la planta. En ocasiones se alcanza una alta concentración de hifas en una zona determinada, tanto en superficie como en el interior de la hoja. No se observaron estructuras especializadas del hongo, tan sólo el engrosamiento de la hifa en el sitio de penetración se podría considerar como un pseudoapresorio. En la Figura 2 se presenta un conjunto de imágenes representativas de las observaciones más relevantes.

El ANOVA para severidad detectó diferencias significativas entre genotipos (Tabla 1), con BPL 710 presentando valores de severidad inferiores a los de Rebaya 40 (Tabla 2). También se encontraron diferencias significativas para el grado de presencia de micelio del hongo en la superficie vegetal, siendo esta presencia mucho mayor en Rebaya 40 que en BPL 710 (Tablas 3 y 2).

Estudio de la germinación de *B. fabae*

A las 6 horas después de la inoculación, el ANOVA puso de relieve diferencias significativas entre genotipos para la germinación de las esporas, que resultó algo superior en BPL 710 (Tabla 4). A las 12 horas tras la inoculación, sin embargo, estas diferencias habían desaparecido (no se muestran los resultados del ANOVA). Los valores de germinación a ambos tiempos se presentan en la Figura 3.

Tabla 1. Análisis de varianza de los efectos de genotipo en la severidad de las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 24 horas de la inoculación para el ensayo de inmunofluorescencia (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	2001,73	2001,73*
Error	6	1720,76	286,78
Total	7	3722,40	

* indica efectos significativos a 0,05 niveles de probabilidad

Figura 2. Imágenes de la infección de *V. faba* por *B. fabae* en el ensayo de inmunofluorescencia. (A) y (B) obtenidas con microscopía de epifluorescencia, el resto con microscopía confocal láser. Las hifas del hongo aparecen de color verde (las esporas no muestran color al no unirse a ellas el anticuerpo primario); los cloroplastos presentan color rojo debido a la fluorescencia de la clorofila, delimitando así las células vegetales. Las flechas señalan los puntos de penetración; e: espora; tg: tubo germinativo; hi: hifa de infección. Las barras horizontales blancas indican la escala en micras. (A) espora doblemente germinada, un tubo germinativo bien desarrollado y otro corto; (B) puntos de penetración de dos hifas, con alta densidad de matriz extracelular en torno a los mismos; (C) penetración reciente, con hifa de infección corta, se observa además la espora, el tubo germinativo y el punto de penetración (la flecha señala el anillo de alta densidad de matriz extracelular); (D) penetración avanzada, con la hifa de infección profundizando en el interior del tejido vegetal.

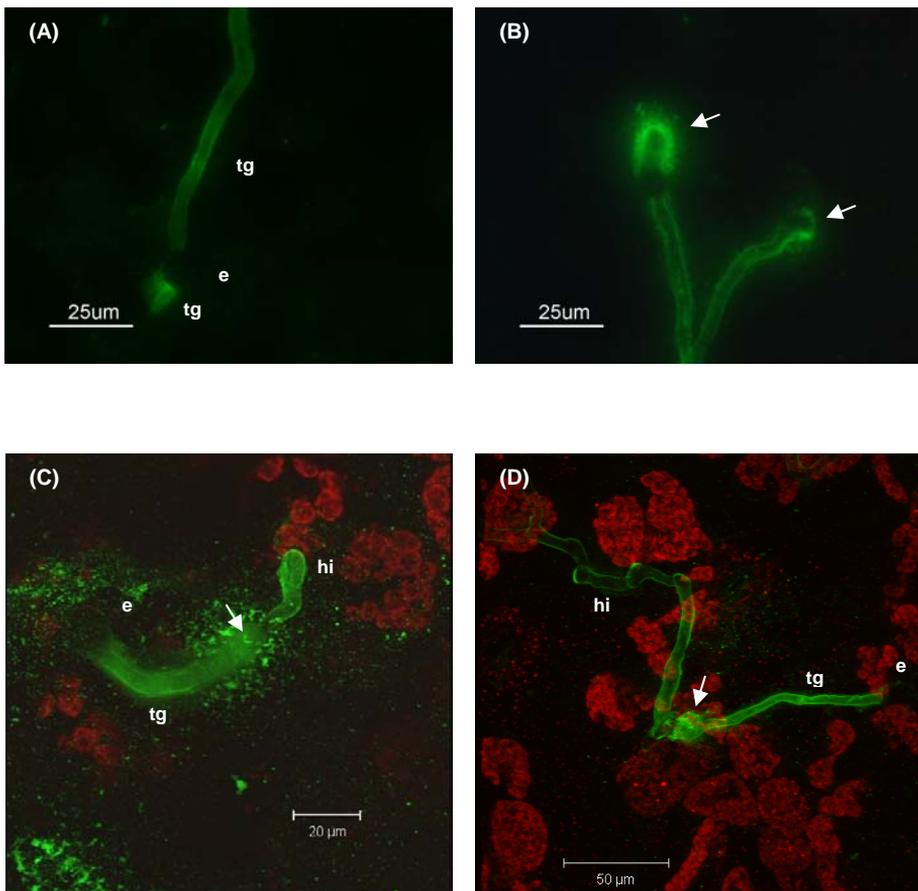


Figura 2 (continuación). Imágenes de la infección de *V. faba* por *B. fabae* en el ensayo de inmunofluorescencia. (E) dos tubos germinativos crecidos a partir de una sola espора, uno ha penetrado y se observa cómo la hifa de infección se ha ramificado en dos tras la penetración, el otro se ha fijado ya sobre el punto de penetración; (F) ramificación en T en el interior del tejido vegetal; (G) alta concentración de hifas, tanto en la superficie como en el interior de la hoja, con hifas de infección extendiéndose para colonizar otras zonas (sólo se han señalado algunas de éstas); (H) células vegetales colapsadas por la infección de *B. fabae* (las hifas del hongo se han eliminado para facilitar la observación de las células de la planta).

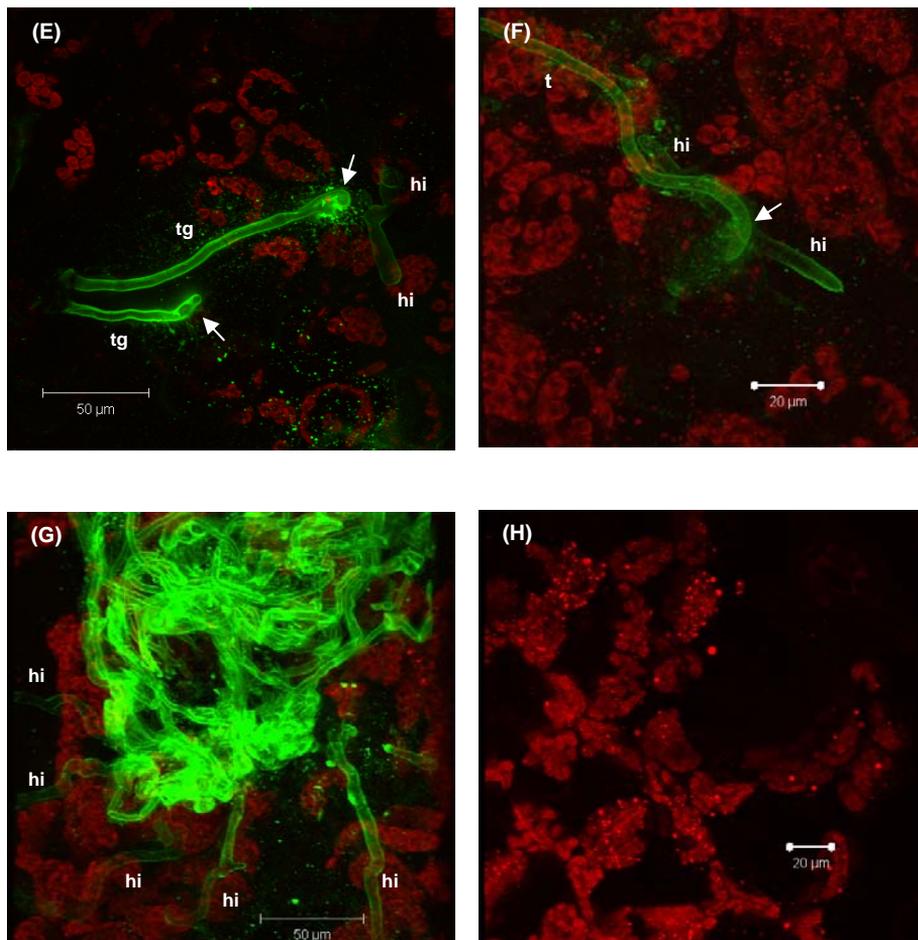


Tabla 2. Valores de severidad y de presencia de micelio de *B. fabae* (según escala de 1-4 descrita en el texto) en las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 24 horas tras la inoculación para el ensayo de inmunofluorescencia. Para cada parámetro evaluado, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión \sqrt{x} ; $p < 0,05$).

Entrada	Severidad	Presencia de micelio
BPL 710	1,07 a	1,10 a
Rebaya 40	33,75 b	3,00 b

Tabla 3. Análisis de varianza de los efectos de genotipo en la escala de presencia de micelio de *B. fabae* sobre las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 24 horas de la inoculación para el ensayo de inmunofluorescencia (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	6,77	6,77**
Error	6	0,70	0,12
Total	7	7,47	

** indica efectos significativos a 0,001 niveles de probabilidad

Tabla 4. Análisis de varianza de los efectos de genotipo en la germinación de las esporas de *B. fabae* sobre las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 6 horas de la inoculación (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	188,74	188,74*
Error	8	150,44	18,80
Total	9	339,18	

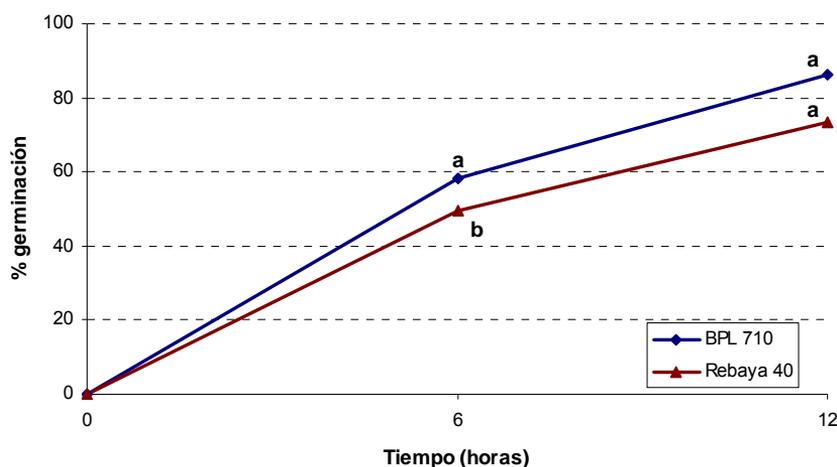
* indica efectos significativos a 0,05 niveles de probabilidad, respectivamente

Tabla 5. Análisis de varianza de los efectos de genotipo en área de las lesiones de las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 48 horas de la inoculación para el ensayo de germinación de las esporas de *B. fabae* (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	2259,75	2259,75*
Error	9	2212,72	245,86
Total	10	4472,47	

* indica efectos significativos a 0,05 niveles de probabilidad, respectivamente

Figura 3. Germinación de las esporas de *B. fabae* sobre las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 6 y 12 horas tras la inoculación. A cada tiempo, los valores que presentan la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p < 0,05$).

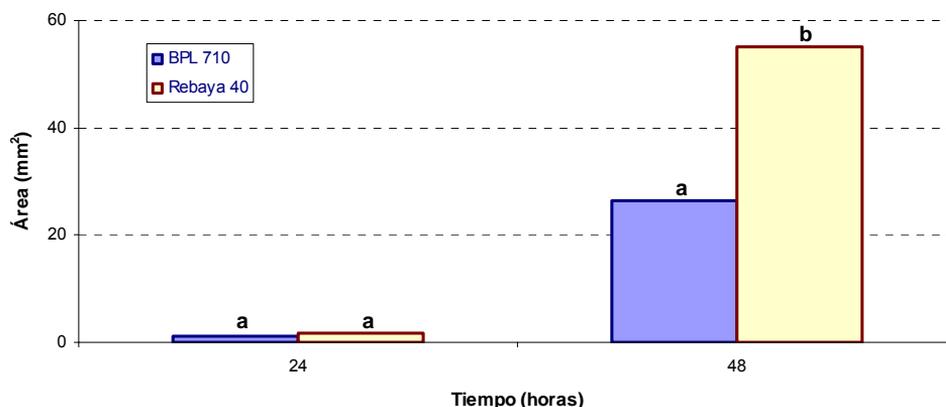


La evaluación de la respuesta a la infección no mostró diferencias significativas entre genotipos para el área infectada a las 24 horas después de la inoculación (no se muestran los resultados del ANOVA); a las 48 horas estas diferencias ya eran patentes, con valores de área medios de 55,17 mm² en Rebaya 40 frente a los 26,38 mm² de BPL 710 (Tabla 5 y Figura 4).

Discusión

A la hora de estudiar la resistencia en *V. faba* a *B. fabae* consideramos de gran importancia observar a nivel microscópico el proceso de infección. Se ha dicho que el proceso de tinción de tejidos es tanto un arte como una ciencia, resultado de la sinergia entre el producto de tinción y otros factores, como la duración del tiempo de tinción, la temperatura de tinción, el desteñido, y, por supuesto, el mismo tejido objeto de tinción (Ruzin, 1999). Aunque existen

Figura 4. Área de las lesiones en las entradas BPL 710 y Rebaya 40 a las 24 y 48 horas tras la inoculación con *B. fabae* para el ensayo de germinación. A cada tiempo, los valores que presentan la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p < 0,05$).



abundantes protocolos para el estudio de los hongos fitopatógenos, este objetivo se convirtió en la práctica en una tarea de difícil realización. El empleo de azul tripán, azul de anilina y Uvitex 2B no dio los resultados deseados, a pesar de las diversas modificaciones que se hicieron sobre los protocolos originales, ya que no permitían ver el hongo en el interior del tejido vegetal. Esto contrasta con el caso de otro patógeno de las habas, *Uromyces viciae-fabae*, que ha podido ser estudiado con éxito con los protocolos anteriores (Sillero y Rubiales, 2002). *Ascochyta fabae*, en cambio, tampoco ha podido ser teñido con estos protocolos para los estudios histológicos (Sillero, comunicación personal). Tanto *B. fabae* como *A. fabae* son necrotrofos, mientras que *U. viciae-fabae* es un hongo biotrofo, por lo que podemos suponer que los necrotrofos presentan dificultades para su tinción para microscopía, al menos en leguminosas. En concordancia con esto, otro hongo necrotrofo, *Mycosphaerella pinodes*, patógeno de guisante, resulta igualmente problemático para ser teñido (Fondevilla, comunicación personal).

La técnica de inmunofluorescencia, en cambio, permitió finalmente el estudio del proceso de infección desde la germinación hasta la postpenetración. La utilización de un compuesto con alta intensidad de fluorescencia como la fluoresceína, así como la eliminación de la epidermis del envés de la hoja para facilitar la entrada de los anticuerpos, parece haber sido determinante para conseguir el resultado deseado. La marcación con anticuerpos ya había sido usada con anterioridad en la interacción *V. faba* / *B. fabae* (Cole et al., 1996; Cole et al., 1998a; Cole et al., 1998b). Estos estudios se habían llevado a cabo fundamentalmente para microscopía electrónica, y se centraron en el papel de la matriz extracelular del hongo tanto en pre- como en post-penetración.

La microscopía confocal ha permitido una visión tridimensional del proceso de infección, facilitando el estudio de cada una de sus etapas. Por lo que sabemos, es la primera vez que se han obtenido imágenes de este tipo en el sistema patogénico *V. faba* / *B. fabae*. Se ha podido observar la distribución espacial de las hifas al crecer y ramificarse en el interior del tejido vegetal, crecimiento que resulta en principio errático y sin patrón determinado. Resulta igualmente destacable la visión de las células vegetales colapsadas tras la infección, colapso citoplasmático que ya había sido descrito en estudios previos de microscopía electrónica (Mansfield y Richardson, 1981).

Es asimismo de gran interés la concentración de matriz extracelular tanto en el sitio de infección como en el mismo punto de penetración, donde es visible el anillo de alta densidad; este anillo ya había sido observado con anterioridad en la interacción *V. faba* / *B. fabae* (Cole et al., 1998b). La matriz extracelular se ha relacionado con la patogénesis, teniendo un papel determinante en la penetración y la muerte de células vegetales. Se ha sugerido que la matriz extracelular sirve para fijar la posición del tubo germinativo en el sitio de penetración, y que incluso podría servir de punto de apoyo para facilitar el impulso necesario para que se inicie la penetración propiamente dicha (Cole et al., 1996). Igualmente, se considera que la matriz puede capturar los fenoles

tóxicos producidos por la planta contra el patógeno, y que puede contener enzimas que facilitan la degradación de la cutícula y de la pared celular de las células vegetales (Cole et al., 1998b). Se ha encontrado que las matrices extracelulares del hongo invaden las células del mesófilo que se sitúan alrededor del punto de infección, y se ha propuesto que la matriz podría contener enzimas necesarias para la nutrición del hongo a costa de estas células (Cole et al., 1998a).

Nuestros estudios han confirmado la respuesta resistente de los genotipos estudiados en los dos ensayos realizados. La naturaleza del proceso infectivo de un hongo necrotrofo como es *B. fabae* hace difícil determinar con claridad en qué consiste la resistencia. A diferencia de otro patógeno de habas como *Uromyces viciae-fabae*, que forma estructuras especializadas como apresorios y haustorios y presenta colonias bien definidas, el proceso de infección de *B. fabae* se reduce a la penetración a través de la epidermis y su crecimiento por el interior del tejido vegetal. Se puede intentar caracterizar la resistencia comparando cuantitativamente la presencia del hongo (tanto en pre-como en post-penetración) en el genotipo resistente con el susceptible. También se puede intentar determinar el número de células vegetales muertas en uno y otro genotipo (Truernit y Haseloff, 2008).

En nuestro caso, hemos encontrado que la presencia del hongo en la superficie de la hoja del genotipo resistente (BPL 710) era inferior que en la del susceptible (Rebaya 40). Esta menor cantidad de patógeno podría explicar en gran medida la respuesta resistente de este genotipo. Dado que el número de esporas depositadas fue el mismo en ambos genotipos, en principio la disminución del patógeno se habría producido o bien antes de la germinación (es decir, que las esporas de *B. fabae* presentasen menor tasa de germinación en BPL 710 y/o no se fijasen sobre el mismo), o bien tras la germinación, lo que sugeriría que el tubo germinativo del hongo no habría logrado adherirse a la superficie vegetal. Tanto en un caso como en otro, dado que el protocolo de

inmunofluorescencia requiere la inmersión de las muestras en diferentes soluciones y consecutivos lavados de las mismas, se habría producido la eliminación superficial del inóculo no adherido.

La primera de las opciones, la del lavado del inóculo antes de la germinación de las esporas, parece quedar descartada por el ensayo de germinación: a las 12 horas después de la inoculación no encontramos diferencias entre las tasas de germinación entre el genotipo resistente y el susceptible, habiendo germinado en ese momento en torno al 80% de todas las esporas. Podemos, pues, formular la hipótesis de que la menor presencia del hongo sobre la epidermis en el genotipo resistente se debe a problemas en la adhesión del tubo germinativo sobre el mismo.

Los hongos patógenos de plantas se adhieren a la superficie de las mismas mediante sustancias adhesivas que están constituidas fundamentalmente por glicoproteínas insolubles en agua, aunque también suelen contener lípidos y polisacáridos; la matriz extracelular que presentan muchos hongos, como *B. fabae*, también juega un papel determinante en la adhesión (Braun y Howard, 1994; Tucker y Talbot, 2001). La adhesión y la progresión de la infección vendrán determinadas por el reconocimiento que el hongo haga de las condiciones adecuadas en el entorno y en el huésped: el tubo germinativo es una estructura especializada que permite al patógeno detectar las señales adecuadas provenientes para esto. Se ha señalado que en este proceso intervienen numerosos factores, que abarcan desde la topología de la hoja hasta la interacción de moléculas como las proteínas integrinas (Tucker y Talbot, 2001) o la composición de las ceras cuticulares (Zelinger et al., 2006). Se puede suponer, por tanto, que la interacción entre *B. fabae* y BPL 710 resulta en la no adhesión del hongo sobre la superficie vegetal, lo que puede indicar falta de reconocimiento de este genotipo por parte del hongo como hospedador, lo que le impediría proseguir con el proceso de infección. Resultaría de gran interés

determinar qué factores están presentes en BPL 710 para impedir la adhesión, dando lugar (al menos en parte) a su resistencia frente a botritis.

En conclusión, este trabajo ha permitido poner a punto un protocolo para la observación a nivel microscópico de la interacción *B. fabae* / *V. faba* en todas las etapas del proceso de infección, tanto en pre- como en post-penetración. Este protocolo resultará de utilidad para futuros estudios, como puede ser la caracterización de la respuesta de diferentes genotipos a botritis. En el caso del genotipo BPL 710, su respuesta resistente parece estar relacionada con una falta de adhesión del patógeno a la superficie vegetal. Será preciso profundizar en esta cuestión, determinando cuáles son los mecanismos involucrados en este tipo de respuesta. Su conocimiento podría ayudar al desarrollo de estrategias de lucha frente a *B. fabae*.

Bibliografía

- Bossi, R., Dewey, F.M., 1992. Development of a monoclonal antibody-based immunodetection assay for *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 41, 472-482.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., 2004. Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica* 135, 55-62.
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Khiati, N.E., 2003. Analysis by detached leaf assay of components of partial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard. *Phytopathologia Mediterranea* 42, 183-190.
- Braun, E.J., Howard, R.J., 1994. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasma* 181, 202-212.
- Cole, L., Dewey, F.M., Hawes, C.R., 1996. Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100, 277-286.
- Cole, L., Dewey, F.M., Hawes, C.R., 1998a. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae* - II. Host cell wall breakdown. *New Phytologist* 139, 611-622.
- Cole, L., Dewey, F.M., Hawes, C.R., 1998b. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae* I. The fungal extracellular matrix in penetration and post-penetration processes. *New Phytologist* 139, 597-609.
- Genre, A., 2008. Confocal microscopy and plant cell biology: A perfect match. *Plant Biosystems* 142, 348-354.
- Hood, M.E., Shew, H.D., 1996. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86, 704-708.

- Mansfield, J.W., Richardson, A., 1981. The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. *Physiological Plant Pathology* 19, 41-&.
- Rohringer, R., Kim, W.K., Samborski, D.J., Howes, N.K., 1977. Calcofluor: an optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67, 808-810.
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Oxford.
- Sillero, J.C., Fondevilla, S., Davidson, J., Patto, M.C.V., Warkentin, T.D., Thomas, J., Rubiales, D., 2006. Screening techniques and sources of resistance to rusts and mildews in grain legumes. *Euphytica* 147, 255-272.
- Sillero, J.C., Rubiales, D., 2002. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. *Phytopathology* 92, 294-299.
- Sillero, J.C., Villegas-Fernandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fernandez-Aparicio, M., Rubiales, D., 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115, 297-307.
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W.D., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223-253.
- Truernit, E., Haseloff, J., 2008. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods* 4.
- Tucker, S.L., Talbot, N.J., 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* 39, 385-417.
- Zelinger, E., Hawes, C.R., Gurr, S.J., Dewey, F.M., 2006. Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68, 209-215.

Capítulo IV

Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a *Botrytis fabae* en *Vicia faba*

Introducción

En la mejora de las especies cultivadas, la selección del material se ha realizado tradicionalmente mediante la elección de aquellos individuos que presentan el rasgo o rasgos de interés. Se garantiza así que los genes idóneos son escogidos. Es preciso, pues, que se den las condiciones para que las características deseadas se pongan de manifiesto, ya sea el porte de la planta, el rendimiento, o la resistencia a un estrés determinado, por ejemplo. Esto supone en muchas ocasiones una inversión elevada de tiempo y/o recursos, lo que hace difícil y costoso el proceso de mejora.

Un marcador es un rasgo que se puede detectar en el fenotipo, bioquímicamente, o mediante un patrón molecular de ADN, y que está asociado a un carácter de interés; un marcador es ventajoso en mejora cuando su detección resulta más fácil o rápida que la expresión del carácter asociado en cuestión, o sea, que la determinación del fenotipo del gen o genes de interés. Los marcadores permiten, pues, una selección más eficiente de los individuos más idóneos en un proceso de mejora.

Los primeros marcadores empleados fueron los morfológicos, basados en alguna característica fácilmente detectable (color de flor o de grano, por ejemplo), pero, entre otros problemas, presentan la limitación de su escaso número. Posteriormente se usaron los marcadores bioquímicos, como las isoenzimas (variantes de una misma enzima); estos son más abundantes y se ha logrado asociar alguno de ellos a genes de interés (Legouis et al., 1995; Abe et al., 1997). Finalmente, el gran salto en el desarrollo de los marcadores genéticos vino con la introducción de los marcadores de ADN, es decir, aquéllos basados en polimorfismos a nivel de secuencia de ADN. Estos marcadores presentan numerosas ventajas, como su gran abundancia (número de polimorfismos), el poder ser detectados en cualquier estado del desarrollo, y la detección de las variaciones con cantidades mínimas de material (Cubero, 2003).

El desarrollo de los marcadores ha estado unido a la elaboración de los mapas genéticos. Estos representan la posición relativa de los marcadores, con las distancias genéticas que los separan (distancias basadas en las frecuencias de recombinación entre los mismos). Los mapas presentan gran utilidad a la hora de localizar genes de interés, cuya ubicación en el mapa se lleva a cabo mediante análisis de ligamiento con los marcadores ya situados.

La selección asistida por marcadores (MAS por sus siglas en inglés) es la selección de individuos portadores de caracteres de interés en función del genotipo para uno o varios marcadores asociados con el carácter. Es una estrategia de gran utilidad para la mejora, ya que facilita y acelera la transferencia de genes de interés a variedades comerciales. En los últimos años se han desarrollado diferentes tipos de marcadores de ADN, y se han aplicado a la selección de caracteres muy diversos en muchos cultivos. La resistencia a enfermedades no ha sido una excepción, y esta técnica se ha empleado en muchos sistemas patogénicos (algunos ejemplos recientes: (Faino et al., 2012; Moghaddam et al., 2012; Truong et al., 2012; Zhang et al., 2012)). Dado que la resistencia es a menudo de naturaleza cuantitativa, estos trabajos están normalmente orientados a la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés). Estos se consideran *regiones de actividad cuantitativa* (Cubero, 2003), es decir, regiones de los cromosomas que son importantes en la manifestación de un carácter cuantitativo. En este caso, los marcadores que flanquean estas regiones serían los utilizados para la MAS.

En los últimos años se han obtenido importantes avances en este campo para algunos de los más importantes estreses bióticos que afectan a *V. faba*: se han construido diferentes mapas de ligamiento, y se han identificado marcadores asociados con genes o QTLs de resistencia. Son los casos de *Uromyces viciae-fabae* (Avila et al., 2003), *Ascochyta fabae* (Avila et al., 2004; Diaz-Ruiz et al., 2009) y *Orobanche crenata* (Diaz-Ruiz et al., 2010). Desafortunadamente, no se ha llevado a cabo hasta el momento ningún trabajo

de este tipo para el sistema patogénico *B. fabae* / *V. faba*; en realidad, no existe mucha información sobre el empleo de marcadores moleculares en las interacciones de *Botrytis* spp. con cualquiera de sus huéspedes (Denby et al., 2004; Finkers et al., 2008; Rowe y Kliebenstein, 2008; Davis et al., 2009). El poder disponer de marcadores para alguna de las fuentes de resistencia para botritis ya encontradas en *V. faba* sin duda incrementaría las oportunidades de hacer llegar a los agricultores cultivares resistentes a medio plazo.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Construir un mapa genético de ligamiento para una población F_2 derivada de un cruzamiento entre una entrada de habas que presenta resistencia parcial a *B. fabae* y otra susceptible.
- Identificar y localizar en dicho mapa de ligamiento QTLs asociados con la mencionada resistencia.

Material y métodos

Se usó para este trabajo el cruzamiento entre la línea BPL 261, que ha sido descrita como parcialmente resistente a botritis y a roya (Sillero et al., 2010), y la línea VF 274, que en nuestros estudios previos ha mostrado ser susceptible a ambas enfermedades. Estas líneas parentales son parte de la colección que existe en el IFAPA de Córdoba. Este cruzamiento se llevó hasta la generación F_3 mediante multiplicación en el campo, proviniendo cada familia F_3 de una planta F_2 ; estas plantas crecieron en un umbráculo con malla contra insectos para evitar la fecundación cruzada entre diferentes familias, buscando de este modo la autofecundación. El mapa de ligamiento se construyó a partir de 114 plantas F_2 y en las plantas F_3 se evaluó la respuesta a la infección con *B. fabae* mediante un experimento en condiciones controladas.

Construcción del mapa de ligamiento

Material vegetal y extracción de ADN

Para la obtención del material vegetal se recogieron hojas de las 114 plantas F₂ del cruzamiento BPL 261 x VF 274 que crecían en el campo, se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su recolección y se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización.

El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de Torres et al. (1993). El ADN obtenido de cada planta se conservó como muestra independiente a -20 °C.

Análisis de marcadores RAPD

Para la amplificación del ADN mediante la técnica PCR (*polymerase chain reaction*: reacción en cadena de la polimerasa) se emplearon marcadores RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*: amplificación al azar de ADN polimórfico) con las condiciones descritas por Williams *et al.* (1990) y los cambios propuestos por Torres et al. (1993). De cada muestra se usaron unos 20-40 ng, con un volumen de reacción de 25 μ l.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal a 105 V (amperaje máximo) en geles de agarosa al 2% (1% de Nu Sieve y 1% de Seakem) con tampón TBE (Tris, Borato y EDTA); a las muestras se les añadieron 5 μ l de azul de bromofenol para marcar el frente de la electroforesis. Para determinar el peso molecular de los diferentes fragmentos se añadió como referencia el bacteriófago Φ x 174, cortado con la enzima de restricción *HaeIII*. El gel se tiñó con bromuro de etidio y las fotografías correspondientes se tomaron con una cámara digital; para su procesamiento se empleó el programa informático Kodak Digital Science 1D (versión 3.5).

Los cebadores RAPD fueron suministrados por la empresa Sigma-Aldrich. Se realizó un cribado previo de los mismos con el objetivo de identificar aquéllos que garantizasen la obtención de bandas polimórficas útiles para el análisis. Se escogieron, pues, 7 muestras de la población y se probaron sobre ellas 781 cebadores, lo que permitió seleccionar 48 con los que analizar la población completa.

Análisis de datos

Para cada banda polimórfica se obtuvo un conjunto de datos de acuerdo con su presencia o ausencia en las distintas muestras. Con la prueba chi-cuadrado (χ^2) se comprobó si estos datos se ajustaban a la segregación 3:1 esperada, descartándose aquellas bandas en las que no era así.

El mapa de ligamiento se construyó con la ayuda del programa MAPMAKER versión 3.0 (Lincoln et al., 1993). Se consideró un valor de LOD (*logarithm to base 10 of odds*: logaritmo en base 10 de las probabilidades) de 3 y una r (fracción de recombinación) de 0,40. Las fracciones de recombinación se expresaron en centiMorgans (cM) mediante la función de Kosambi (Kosambi, 1943).

Evaluación de la respuesta a *B. fabae*

Material vegetal

Se emplearon un total de 108 familias F_3 derivadas del cruzamiento BPL 261 x VF 274, evaluándose 12 plantas por familia. La evaluación se llevó a cabo en tres tandas independientes, ya que no se disponía de espacio para realizarla de una sola vez, incluyendo 4 plantas de cada familia por tanda. Se sembraron dos semillas de cada familia en una maceta de plástico de un litro y medio de volumen llena con una mezcla de arena y turba (1:1, v:v). Como testigos, se emplearon el parental BPL 261 y la línea ILB 365 (usada por el ICARDA para sus programas de mejora de resistencia a botritis como testigo

susceptible). Crecieron en una cámara climática a 20 °C con un fotoperiodo de 14 horas ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ de intensidad de luz) y 10 horas de oscuridad.

Material patológico

Se utilizó un aislado monospórico de *Botrytis fabae* procedente de Túnez (IBf24). Se sembró en placas Petri (de 9 cm de diámetro) con medio PDA (patata, dextrosa, agar) y creció en un incubador con una temperatura de 19 °C y un ciclo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz (visible + ultravioleta cercano). Tras 12 días las placas estaban cubiertas por una densa capa de conidióforos.

Inoculación

Para recoger las esporas se vertió una solución de glucosa (1,2% p/v) en cada placa Petri (unos 10-15 ml por placa) y las esporas se liberaron empleando un asa de siembra. La suspensión resultante se filtró a través de una malla de nylon (200 micras de paso) y la concentración se ajustó a 350.000 esporas/ml con la ayuda de un hematocitómetro. Finalmente, se añadió Tween-20 a la suspensión (0,03% v/v).

Las plantas se inocularon cuando tenían entre 4 y 6 hojas completamente expandidas (dos semanas después de haber sido sembradas). Se usó un pulverizador, cubriendo cada planta con aproximadamente 1,5 ml de la suspensión de esporas. Se transfirieron seguidamente a una cámara de inoculación, donde se mantuvieron durante 12 horas a 20 °C en oscuridad. Posteriormente se trasladaron de nuevo a la cámara climática, en las mismas condiciones de crecimiento pero manteniendo la humedad relativa por encima del 90%.

Evaluación y análisis de los datos

Transcurridos 6 días desde la inoculación, se evaluó la severidad de la enfermedad en cada planta. La severidad se define como el porcentaje de la superficie de la planta cubierta por lesiones.

Para comprobar la homogeneidad de las tandas se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para las severidades de los genotipos BPL 261 e ILB 365, siendo tanda el factor fijo. Asimismo, se llevó a cabo otro ANOVA para severidad con el objeto de detectar si existían diferencias significativas entre familias. Cada maceta se consideró como una repetición (tomando el valor medio de las severidades de las dos plantas) y las tandas como bloques. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk, y se calcularon los correspondientes parámetros de simetría y de Kurtosis para determinar las características de la distribución (Lynch y Walsh, 1998).

Identificación de QTLs de resistencia a *B. fabae*

Para el análisis de QTLs se emplearon los datos del mapa de ligamiento y los datos de severidad de la evaluación de las familias F₃. Se usó el programa QTL CARTOGRAPHER (Wang et al., 2005), que incluye tres métodos diferentes de análisis: el análisis de regresión lineal, el análisis de intervalos simple (SIM: *Simple Interval Mapping*) y el análisis de intervalos compuesto (CIM: *Composite Interval Mapping*). Para este último caso, la selección de los marcadores que se usaron como cofactores se hizo mediante el método *Forward-Backward Stepwise Regression*, tomando un valor para p (*Fin*) y p (*Fout*) de 0,05. Los valores de LR (*likelihood ratio*: ratio de probabilidad) obtenidos se convirtieron en valores de LOD mediante la expresión: $LR = LOD (2 \times \ln 10)$.

Tras realizar el análisis CIM, el valor crítico de LR para aceptar la existencia de un QTL se obtuvo por el método de permutaciones propuesto por

Churchill y Doerge (1994) y Doerge y Churchill (1996). Se llevaron a cabo 1.000 permutaciones de los datos originales obteniéndose un valor umbral de LR de 15,84 o lo que es igual: un LOD para la aceptación de existencia de un QTL de 3,44. El intervalo de confianza (IC) con el 95% de probabilidad de localización de un QTL se calculó el método propuesto por Vanooijen (1992). Según este método, los extremos de cada intervalo son aquellos puntos a derecha e izquierda del máximo de la curva de LOD que se corresponden con una reducción de dos unidades de dicho valor máximo. La acción génica se determinó mediante el cociente dominancia/aditividad (d/a), siguiendo el criterio de (Stuber et al., 1992): aditividad, $|d/a| < 0,2$ o d no significativamente distinto de cero; dominancia parcial, $0,2 < |d/a| < 0,8$; dominancia, $0,8 < |d/a| < 1,2$; súperdominancia, $|d/a| > 1,2$.

Resultados

Construcción del mapa de ligamiento

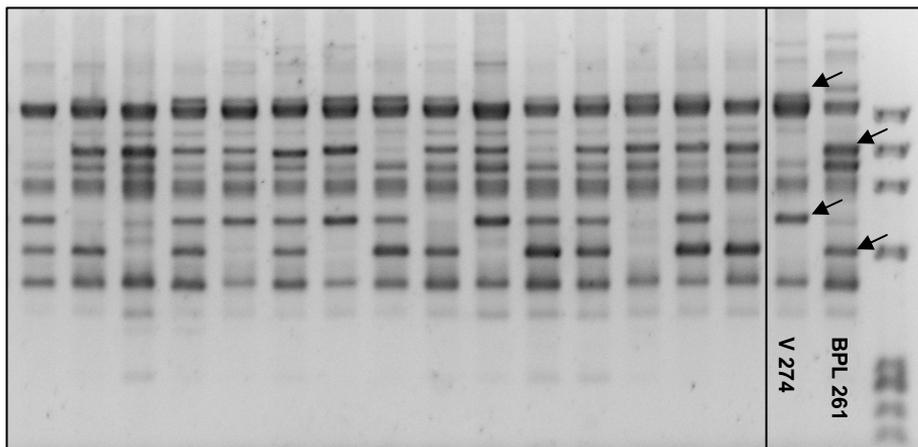
Los 48 cebadores dieron lugar a 109 marcadores polimórficos, obteniéndose una media de 2,3 marcadores por cebador (un ejemplo de polimorfismo se muestra en la Figura 1). De éstos, 92 se mapearon en 17 grupos de ligamiento (Figura 2). Los grupos mayores incluían 13 marcadores, mientras que los más pequeños estaban compuestos de tan sólo dos. En conjunto los 17 grupos cubren 718,7 cM del genoma de *V. faba*, con una distancia media entre marcadores de 7,81 cM.

Evaluación de la respuesta a *B. fabae*

Se obtuvo un amplio rango de respuesta a la infección por botritis (Figura 3). La severidad media fue de 25,17, con 9,95 de desviación estándar. El valor máximo de severidad por familia alcanzado fue 47,8, mientras que el

mínimo fue 7,2 (las severidades de BPL 261 y del testigo susceptible ILB 365 fueron 17,8 y 36,9, respectivamente). Los análisis de varianza para BPL 261 e

Figura 1. Patrón RAPD obtenido al amplificar con el cebador OPAG05 el ADN genómico de 15 plantas F_2 del cruzamiento BPL 261 x VF 274. Se muestran también los patrones de los parentales (separados del resto de muestras por una línea vertical). Las flechas señalan bandas polimórficas. A la derecha de BPL 261 aparece el patrón de peso molecular.



ILB 365 pusieron de manifiesto que las tandas fueron homogéneas entre sí (datos no mostrados). Sí se encontraron diferencias significativas entre familias para la severidad (ANOVA en Tabla 1). El test de Shapiro-Wilk mostró que los datos de severidad se ajustaban a una distribución normal ($p = 0,07$); el valor de simetría fue 0,22, y el de kurtosis -0,66.

Identificación de QTLs de resistencia a *B. fabae*

El método de regresión lineal detectó significación en 5 marcadores (Tabla 2). El de mayor significación ($p < 0,001$) se situó en el GL 15. El análisis de intervalos simple mostró una región asociada a la resistencia, igualmente en el grupo de ligamiento 15, con un valor de LOD de 4,23 (Tabla 3). También el análisis de intervalos compuesto (con dos marcadores elegidos como cofactores, Tabla 4) encontró una región asociada a la resistencia en el

Figura 2. Mapa de ligamiento de la F2 obtenida del cruzamiento BPL 261 x V 274. Se indica la localización del QTL *Bf1*. (GL: grupo de ligamiento).

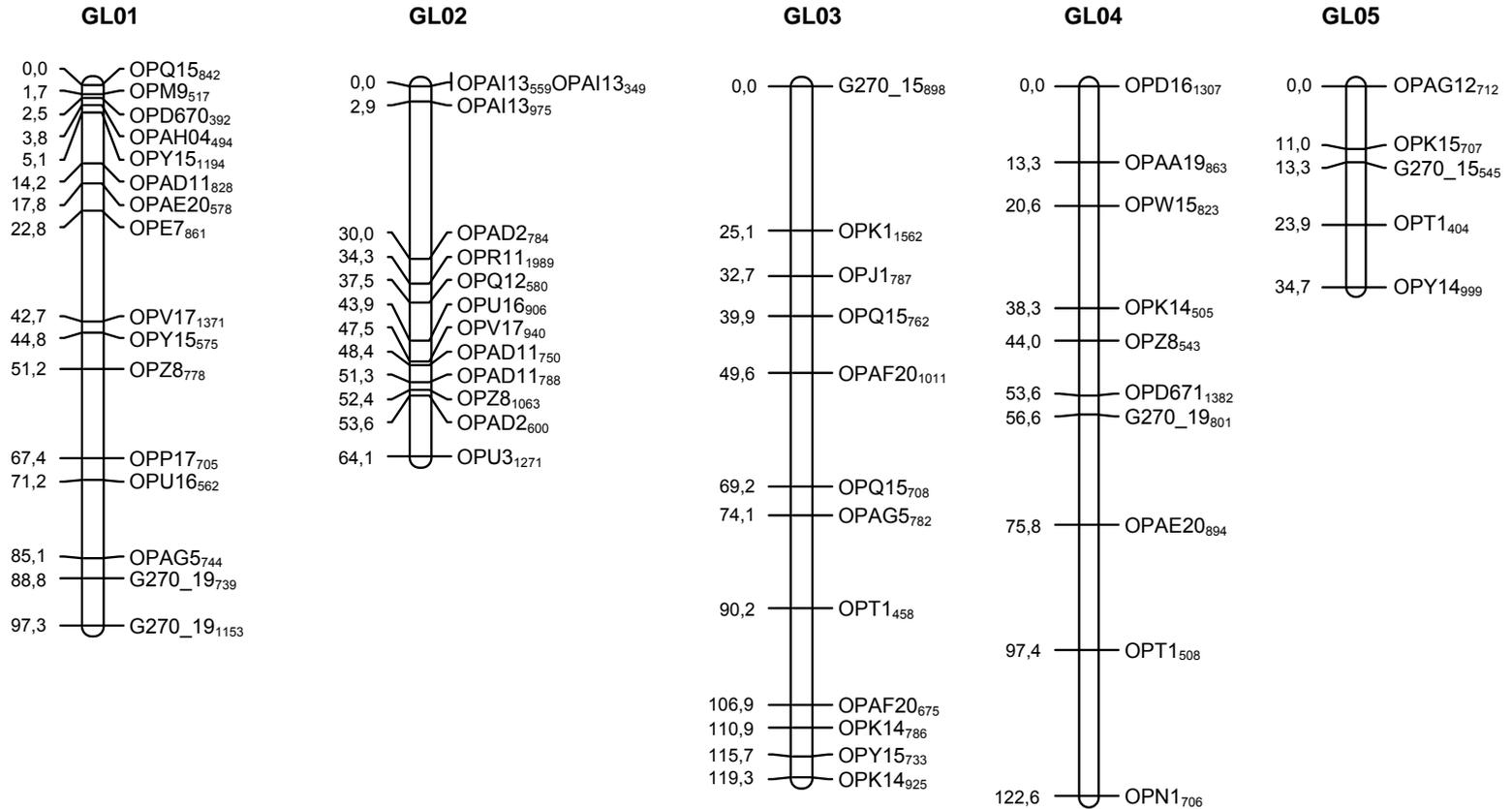
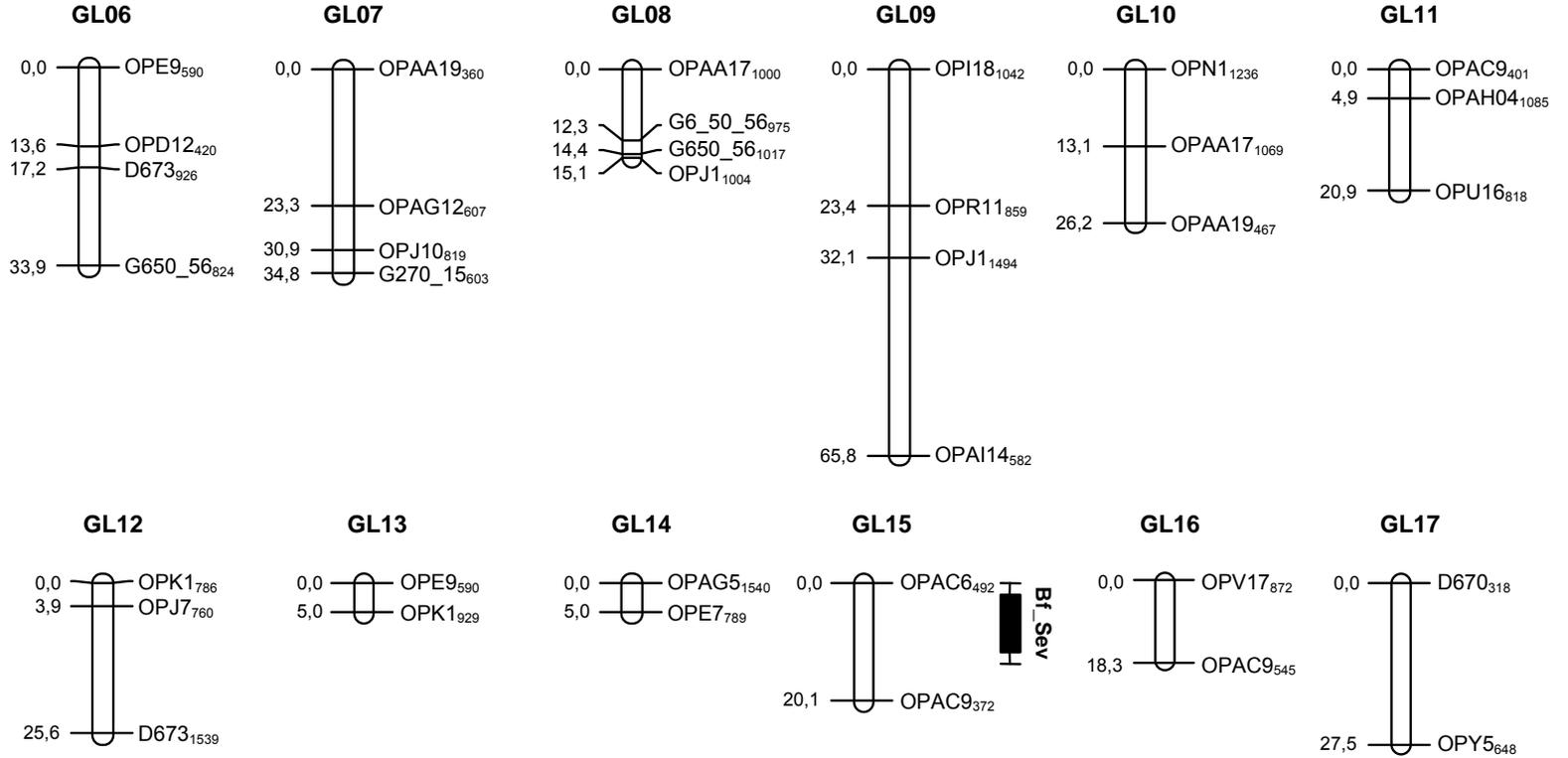


Figura 2. Continuación.



grupo de ligamiento 15, pero en este caso con un LOD de 3,91 (Figura 4). Este máximo de LOD se situó en un intervalo de 20,1 cM, entre los marcadores OPAC06₄₉₂ y OPAC09₃₇₂, a 6 cM del primero (Tabla 5). El QTL así localizado, denominado *Bf 1* (Figura 4), explicó el 40,31% de la variación del carácter, presentando un efecto de superdominancia ($|d/a| = 8,49$).

Figura 3. Distribución por rangos de severidad de las 108 familias evaluadas para infección por *B. fabae* en condiciones controladas. Se muestran las posiciones del parental BPL 261 y del testigo susceptible ILB 365.

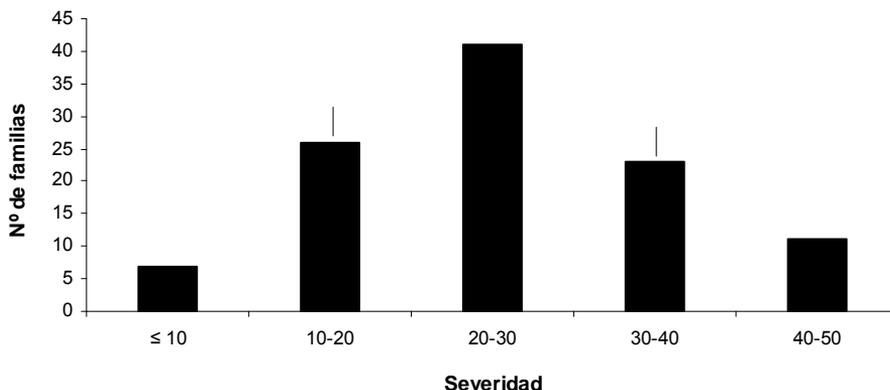


Tabla 1. Análisis de varianza de los efectos de familia en la severidad por infección con *B. fabae* de las 108 familias F₃ obtenidas del cruzamiento BPL 261 x V 274 (GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: fracción de la suma de cuadrados asociada a cada término o interacción).

Fuente	GL	SC	CM
Familia	107	112756	1053,79***
Repetición	2	17959	8979,54
Error	1076	328771	305,55
Total	1185		

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

Tabla 2. Regresión simple para severidad frente a infección por *B. fabae* ($y = b_0 + b_1x + e$). La hipótesis para el estadístico F es que el marcador no está ligado a la severidad (GL: grupo de ligamiento).

GL	Marcador	b0	b1	LOD	F
9	OPR11 ₈₅₉	25,127	3,500	1,148	5,316*
9	OPJ01 ₁₄₉₄	25,114	3,832	1,413	6,578*
11	OPU16 ₈₁₈	25,062	-3,437	1,078	4,987*
15	OPAC06 ₄₉₂	25,298	5,420	2,581	12,306***
15	OPAC09 ₃₇₂	25,219	3,463	0,992	4,578*

Tabla 3. Análisis de intervalos simple (SIM) para severidad a *B. fabae* (GL: grupo de ligamiento).

GL	Longitud intervalo (cM)	Marcadores adyacentes	Regresión simple (p)	Posición de QTL	LOD
15	20,1	OPAC06 ₄₉₂ OPAC09 ₃₇₂	< 0,001 < 0,05	6	4,23

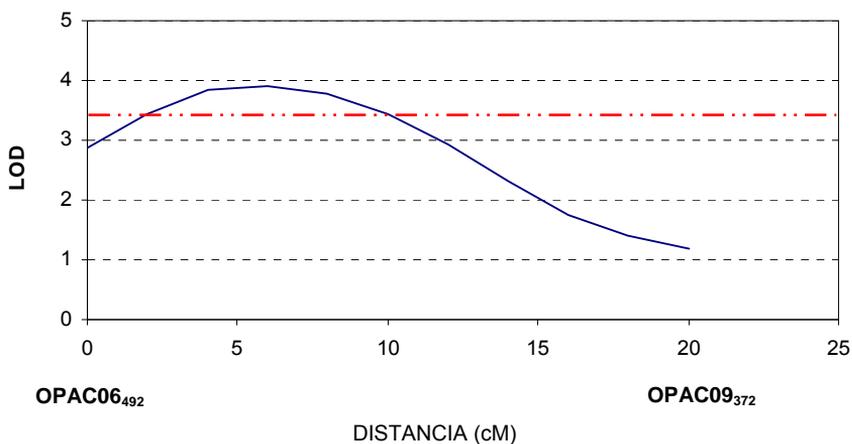
Tabla 4. Marcadores seleccionados como cofactores por el método *Forward-Backward stepwise regression* para el carácter severidad a botritis (GL: grupo de ligamiento; gl: grados de libertad).

GL	Marcador	Orden	F	gl
15	OPAC06 ₄₉₂	1	13,97	105
9	OPJ01 ₁₄₉₄	2	7,28	103

Tabla 5. Análisis de intervalos compuesto (CIM) para severidad a botritis (GL: grupo de ligamiento; LI: longitud de intervalo; Pos. QTL: distancia del QTL al primer marcador del intervalo (en cM); a: aditividad; d: dominancia; AG: acción génica; SD: superdominancia; R²: porcentaje de la varianza fenotípica explicada por el QTL; IC: intervalo de confianza).

GL	LI (cM)	Marcadores adyacentes	Pos. QTL	LOD	a	d	d/a	AG	R ²	IC (cM)
15	20,1	OPAC06 ₄₉₂ OPAC09 ₃₇₂	6	3,91	1,52	12,91	8,49	SD	40,31	15

Figura 4. Gráfica de LOD del método de análisis de intervalos compuesto (CIM) para el carácter severidad a *B. fabae* en el grupo de ligamiento 15. La línea roja discontinua indica el valor umbral de LOD (3,44) para aceptación de la existencia de un QTL. Se señala asimismo la posición de los marcadores flanqueantes (cM: centimorgan).



Discusión

La mejora por resistencia a enfermedades es una tarea compleja y de larga duración, que abarca desde encontrar los genes apropiados entre las fuentes potenciales de resistencia, hasta la incorporación de los mismos en fondos genéticos de interés comercial. A lo largo de este proceso se requiere evaluar el material vegetal frente a la infección, ya sea para estudiar las colecciones de germoplasma o para localizar los genes de resistencia en las poblaciones segregantes. Para facilitar esta última tarea se viene proponiendo ya desde hace años la selección asistida por marcadores (MAS). La evaluación de enfermedades suele ser costosa, tanto en términos de recursos como de tiempo y, además, no siempre se dispone de métodos adecuados y fiables para la misma. Por lo tanto, el empleo de marcadores podría resultar una estrategia más eficiente para este tipo de mejora.

Ese es el planteamiento que hemos seguido en este trabajo. La MAS puede ser una herramienta útil en el caso particular de botritis. Dado que sólo se han identificado resistencias parciales a botritis, la MAS sería una estrategia muy útil para mejorar la eficiencia de selección de los individuos resistentes en el programa de mejora y además, facilitaría la acumulación de genes a partir de distintas fuentes de resistencia. La entrada BPL 261 es apropiada para este tipo de estudio: presenta resistencia parcial tanto a botritis como a roya (Sillero et al., 2010). Si se deseara introducir ambas resistencias en variedades comerciales, la MAS resultaría muy ventajosa.

La evaluación de enfermedades se realiza normalmente en ensayos de campo. Sin embargo, los ensayos en condiciones controladas en el laboratorio pueden resultar de gran utilidad en este tipo de trabajos: permiten reducir la variabilidad ambiental, poniendo de relieve más claramente la respuesta fisiológica de la planta al patógeno; de este modo, los loci de resistencia que se detecten se corresponderán con los mecanismos biológicos que están involucrados en la defensa del huésped, al prescindir de los factores ambientales que se encuentran en los ensayos de campo. La línea BPL 261 ha presentado buena correlación entre los resultados de los ensayos en campo y los de condiciones controladas, como se ha visto en el capítulo 2, por lo que se decidió llevar a cabo la evaluación de la población F_3 en el laboratorio.

En cuanto al desarrollo del mapa cabe destacar que aunque la media de marcadores polimórficos por cebador es sólo algo inferior a la obtenida en otros trabajos similares de nuestro grupo (2,3 frente a 2,9 y 2,6 (Román, 2000; Ávila, 2002)), ha existido una gran dificultad a la hora de encontrar marcadores polimórficos. De hecho hemos tenido que probar más de 700 cebadores en comparación con los algo más de 400 probados en dichos trabajos. Será necesario tener en cuenta este bajo polimorfismo encontrado a la hora de trabajar en el mapeo de esta población sobre todo de cara a la saturación de regiones portadoras de QTLs de interés para la mejora de la especie.

La evaluación de las familias F_3 ha mostrado una distribución normal y continua de los diferentes valores de severidad; esto se corresponde con el hecho de estar trabajando con un carácter cuantitativo, es decir, un carácter que en principio se supone que está controlado por múltiples genes que suman sus efectos pequeños para dar lugar a la respuesta final. En este trabajo sólo hemos detectado un QTL, lo que no es sorprendente ya que, debido al modesto número de marcadores empleado, grandes regiones del genoma han quedado sin mapear. Llama en principio la atención que este QTL explique casi la mitad de la respuesta de resistencia. Sin embargo, es bastante frecuente que la mayoría de la variación en las interacciones planta-patógeno se deba a unos pocos QTLs, con uno o dos predominantes (Young, 1996).

Parece que este podría ser también el caso de nuestra población experimental. La entrada BPL 261 no presenta una respuesta a *B. fabae* consistente y estable en todos los ambientes donde se ha evaluado, de modo que la reacción de resistencia parcial sólo tiene lugar en algunos casos (Capítulo 1). Se sabe que las resistencias estables son normalmente multigénicas, ya que cuanto mayor es el número de genes que controlan la resistencia, más difícil es para el patógeno superar la misma (Parlevliet, 2002). Aunque es cierto que con nuestro estudio todavía queda un elevado porcentaje de variación sin explicar, se podría formular la hipótesis de que la menor estabilidad de la resistencia en la entrada BPL 261 se debe al hecho de que está controlada por un número limitado de loci. En cualquier caso, esta cuestión debería ser el objeto de futuros trabajos.

No obstante lo anterior, algunas consideraciones sí deberían hacerse. Por lo que se refiere a la variación fenotípica atribuible al QTL, Beavis (1994) concluyó que los trabajos llevados a cabo con poblaciones de entre 100 y 200 individuos presentan un sesgo hacia la sobreestimación de los efectos de los QTLs detectados, aunque esos QTLs sí serían reales, sólo que responsables de una variación menor. Esto, por un lado, subraya el hecho de que nuestros

resultados son preliminares pero, por otro, confirma la importancia del QTL localizado, que aporta información de gran utilidad para el trabajo futuro orientado a la mejora. También se ha de considerar que el QTL detectado podría en realidad estar constituido por grupos de genes muy próximos unos a otros: Austin y Lee (1996) señalaron que los QTLs que se encuentran en las poblaciones F_2 pueden separarse en múltiples QTLs ligados entre sí (cada uno responsable de efectos fenotípicos menores) cuando se mapean en líneas puras recombinantes (RIL por sus siglas en inglés) en las que han tenido lugar recombinaciones adicionales (Austin y Lee, 1996). En la actualidad se dispone de una RIL del cruzamiento BPL 261 x V 274, por lo que esta cuestión podría resolverse en el futuro.

Finalmente, debemos señalar que nuestros resultados contrastan con los de trabajos previos llevados a cabo en *Botrytis cinerea*. Esos estudios se limitaron a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Denby et al., 2004) y a tomate, en este caso con fuentes de resistencia provenientes de tomates silvestres (Finkers et al., 2007; Davis et al., 2009). En todos estos casos se detectaron varios QTLs, aunque la mayoría de ellos responsables de una proporción muy pequeña de la variación fenotípica (alrededor del 10% o menos, con sólo alguna excepción en torno al 20%). En vista de esto, Bfl resulta ser de gran interés para trabajos futuros encaminados a una mejor comprensión de la interacción de *Botrytis* spp. con sus huéspedes.

En conclusión, este trabajo ha permitido, por una parte, construir un mapa de un cruzamiento útil para el estudio de dos enfermedades importantes de habas, botritis y roya; por otra parte, se ha identificado por primera vez un QTL responsable de la resistencia a *B. fabae*. Todo esto abre la puerta a diferentes proyectos para el futuro, tales como: saturar el mapa, incrementando el número de marcadores; identificar los loci responsables de la variación todavía no asignada; validar los QTLs detectados en diferentes ambientes y fondos genéticos; y emplear la selección asistida por marcadores para introducir

esta resistencia en variedades de interés comercial. El hecho de disponer de una RIL de este cruzamiento facilitará el desarrollo de estos trabajos.

Bibliografía

- Abe, J., Guan, G.P., Shimamoto, Y., 1997. A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* 94, 137-144.
- Austin, D.F., Lee, M., 1996. Comparative mapping in F-2:3 and F-6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 817-826.
- Ávila, C.M., 2002. Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a *Ascochyta fabae* y *Uromyces viciae-fabae* en habas (*Vicia faba* L.). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Avila, C.M., Satovic, Z., Sillero, J.C., Rubiales, D., Moreno, M.T., Torres, A.M., 2004. Isolate and organ-specific QTLs for ascochyta blight resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1071-1078.
- Avila, C.M., Sillero, J.C., Rubiales, D., Moreno, M.T., Torres, A.M., 2003. Identification of RAPD markers linked to the Uvf-1 gene conferring hypersensitive resistance against rust (*Uromyces viciae-fabae*) in *Vicia faba* L. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 353-358.
- Beavis, W.D., 1994. The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. En: ASTA (Ed.), 49th Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, Washington DC.
- Cubero, J.I., 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-971.
- Davis, J., Yu, D., Evans, W., Gokirmak, T., Chetelat, R.T., Stotz, H.U., 2009. Mapping of loci from *Solanum lycopersicoides* conferring resistance or susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Theor Appl Genet* 119.

- Denby, K.J., Kumar, P., Kliebenstein, D.J., 2004. Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 38, 473-486.
- Diaz-Ruiz, R., Satovic, Z., Avila, C.M., Alfaro, C.M., Gutierrez, M.V., Torres, A.M., Roman, B., 2009. Confirmation of QTLs controlling *Ascochyta fabae* resistance in different generations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Crop & Pasture Science* 60, 353-361.
- Diaz-Ruiz, R., Torres, A.M., Satovic, Z., Gutierrez, M.V., Cubero, J.I., Roman, B., 2010. Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theoretical and Applied Genetics* 120, 909-919.
- Doerge, R.W., Churchill, G.A., 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142, 285-294.
- Faino, L., Azizinia, S., Hassanzadeh, B.H., Verzaux, E., Ercolano, M.R., Visser, R.G.F., Bai, Y.L., 2012. Fine mapping of two major QTLs conferring resistance to powdery mildew in tomato. *Euphytica* 184, 223-234.
- Finkers, R., Bai, Y.L., van den Berg, P., van Berloo, R., Meijer-Dekens, F., ten Have, A., van Kan, J., Lindhout, P., van Heusden, A.W., 2008. Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica* 159, 83-92.
- Finkers, R., van den Berg, P., van Berloo, R., ten Have, A., van Heusden, A.W., van Kan, J.A.L., Lindhout, P., 2007. Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 585-593.
- Kosambi, D.D., 1943. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12, 172-175.
- Legouis, J., Erdogan, M., Friedt, W., Ordon, F., 1995. Potential and limitations of isozymes for chromosomal localization of resistance genes against barley mild mosaic virus (BaMMV). *Euphytica* 82, 25-30.
- Lincoln, S.E., Daly, M.J., Lander, E.S., 1993. MAPMAKER/EXP. Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA.

- Lynch, M., Walsh, B., 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associated, Inc., Sunderland, MA.
- Moghaddam, H.H., Leus, L., De Riek, J., Van Huylenbroeck, J., Van Bockstaele, E., 2012. Construction of a genetic linkage map with SSR, AFLP and morphological markers to locate QTLs controlling pathotype-specific powdery mildew resistance in diploid roses. *Euphytica* 184, 413-427.
- Parlevliet, J.E., 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124, 147-156.
- Román, B., 2000. Empleo de marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a jopo (*Orobanche crenata* Forsk.) en habas (*Vicia faba* L.). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Rowe, H.C., Kliebenstein, D.J., 2008. Complex genetics control natural variation in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Botrytis cinerea*. *Genetics* 180, 2237-2250.
- Sillero, J.C., Villegas-Fernandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fernandez-Aparicio, M., Rubiales, D., 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115, 297-307.
- Stuber, C.W., Lincoln, S.E., Wolff, D.W., Helentjaris, T., Lander, E.S., 1992. Identification of genetic-factors contributing to heterosis in a hybrid from 2 elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132, 823-839.
- Torres, A.M., Weeden, N.F., Martin, A., 1993. LINKAGE AMONG ISOZYME, RFLP AND RAPD MARKERS IN VICIA-FABA. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 937-945.
- Truong, H.T.H., Kim, K.T., Kim, D.W., Kim, S., Chae, Y., Park, J.H., Oh, D.G., Cho, M.C., 2012. Identification of isolate-specific resistance QTLs to phytophthora root rot using an intraspecific recombinant inbred line population of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathology* 61, 48-56.

- Vanooijen, J.W., 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics* 84, 803-811.
- Wang, S., Basten, C.J., Gaffney, P., Zeng, Z.B., 2005. Windows QTL Cartographer version 2.5. *Statistical Genetics*, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Young, N.D., 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual review of phytopathology* 34, 479-501.
- Zhang, D.F., Liu, Y.J., Guo, Y.L., Yang, Q., Ye, J.R., Chen, S.J., Xu, M.L., 2012. Fine-mapping of qRfg2, a QTL for resistance to *Gibberella* stalk rot in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 124, 585-596.

Capítulo V

Caracterización de la interacción *Medicago truncatula* / *Botrytis* spp. mediante el estudio de expresión de factores de transcripción

Introducción

Se ha visto en capítulos anteriores que en la mejora por resistencia a enfermedades no sólo es importante encontrar material vegetal con altos niveles de resistencia, sino que también es conveniente investigar los mecanismos responsables de esa resistencia. Esto es de utilidad para comprender el modo en que la planta se defiende de la infección, lo que puede facilitar la selección de los genes de interés y, en su caso, la combinación e integración de los mismos en nuevas variedades. La caracterización de los mecanismos de resistencia es una tarea compleja que abarca desde el nivel macroscópico hasta el molecular. Desafortunadamente, en el caso de *V. faba* los estudios moleculares han sido escasos en comparación con otras especies, por lo que existen carencias importantes tanto en términos de conocimiento como de disponibilidad de técnicas (Varshney et al., 2009).

Medicago truncatula Gaertn. se ha convertido en los últimos años en una planta modelo para las leguminosas, y existe una cantidad importante de información fisiológica y molecular sobre la misma (Rose, 2008; Young y Udvardi, 2009). Se la considera de gran utilidad para llevar a cabo estudios sobre las interacciones planta-patógeno, y se han elaborado trabajos interesantes al respecto (Tivoli et al., 2006; Rispaill et al., 2010). En lo que se refiere a *Botrytis* spp., es posible conseguir la infección en condiciones controladas en el laboratorio (Ellwood et al., 2007) aunque por lo que sabemos estos patógenos no infectan *M. truncatula* en la naturaleza. El estudio de esta interacción entre *M. truncatula* y *Botrytis* spp. podría aportar información útil para comprender mejor el sistema patogénico *V. faba* / *B. fabae*. También resultaría de interés disponer de genotipos de *M. truncatula* con respuesta diferencial a *Botrytis* spp., aunque, por lo que sabemos, no se ha informado hasta la fecha de la existencia de los mismos.

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas que se unen a secuencias de ADN específicas que se encuentran en los promotores o en los intensificadores de los genes y que, interaccionando con otros reguladores de la transcripción (como proteínas que modifican la cromatina), facilitan o bloquean el acceso del ARN al molde de ADN para formar el complejo de transcripción. De este modo regulan la transcripción, pudiendo ser activadores o inhibidores de la misma. Cada ruta metabólica consta de múltiples pasos en los que intervienen enzimas, y los genes de cada enzima están regulados por FTs (Iwase et al., 2009). Se calcula que en torno al 7% de las secuencias codificadoras del genoma vegetal se corresponde con FTs (Udvardi et al., 2007). Los factores de transcripción se clasifican en familias, las cuales se suelen definir por el dominio de unión al ADN que poseen. Es frecuente encontrar en la descripción de las familias referencias a dominios estructurales tales como dedo de zinc, cremallera de leucina o hélice-giro-hélice.

Los factores de transcripción son cruciales para el desarrollo y la diferenciación vegetal, y participan en la regulación de las diferentes respuestas de la planta al ambiente, incluidas las respuestas de resistencia a las enfermedades (Singh et al., 2009). La identificación de aquellos que estén involucrados en estas últimas supondría un paso importante para desvelar los complejos mecanismos responsables de las resistencias, y abriría puertas para, en el futuro, poder llegar a manipular las rutas metabólicas implicadas en las mismas (Iwase et al., 2009). Los estudios de expresión son una herramienta útil para esta identificación, ya que permiten comparar la cantidad de transcritos de ARN presentes en diferentes situaciones biológicas, como pueden ser respuestas de resistencia y susceptibilidad a patógenos. Los FTs suelen presentar niveles de expresión muy bajos en comparación con los de otros genes; por lo tanto, para su estudio se requiere una técnica muy sensible, como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés), que se calcula que es al menos 100 veces más sensible que los “arrays” de ADN a la hora de detectar los transcritos, pudiendo llegar a detectar hasta un transcrito

por cada 1.000 células (Czechowski et al., 2004). Esta técnica permite cuantificar la acumulación del producto de PCR con cada ciclo de amplificación, lo que posibilita estimar la cantidad inicial de transcrito de cada gen. En el caso de *M. truncatula* se ha desarrollado una plataforma basada en la qPCR para el estudio de los factores de transcripción. Dicha plataforma consiste en una colección de 1.084 cebadores de genes putativos de factores de transcripción cuya amplificación ha sido sistematizada para que se pueda realizar de modo rápido y eficiente, facilitando así la cuantificación de los mismos (Kakar et al., 2008). Esta plataforma ha sido ya empleada para varios estudios (Verdier et al., 2008; Gao et al., 2010; Madrid et al., 2010).

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Identificar entradas de *M. truncatula* con respuesta diferencial a la infección por *Botrytis* spp.
- Elaborar el perfil de expresión de los factores de transcripción de dos genotipos de *M. truncatula* en su interacción diferencial con *B. fabae* y *B. cinerea*.

Material y métodos

Evaluación de los genotipos de *Medicago truncatula*

Se estudió en condiciones controladas la respuesta de dos entradas de *M. truncatula* a *B. fabae* y a *B. cinerea*. Se realizaron dos experimentos independientes, con cuatro repeticiones en el primero y diez en el segundo (cada repetición consistía en una planta individual). También se llevó a cabo otro ensayo para observar a nivel microscópico los primeros estadios de la infección a dos tiempos diferentes, con tres repeticiones por tiempo. El manejo

del material vegetal y de los patógenos fueron los mismos para los tres experimentos.

Material vegetal

Tras estudios previos en los que se determinó la respuesta de diferentes genotipos de *M. truncatula* a *Botrytis* spp., se escogieron para este estudio dos entradas de *M. truncatula*, ambas facilitadas por el Dr. J. M. Prosperi (INRA, Montpellier, Francia): la línea A17 (cultivar Jemalong) y la línea Esp162. Se sembró una semilla de cada entrada en una maceta de plástico de medio litro de volumen llena con una mezcla de arena y turba (1:1, v:v). Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento a 20 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz visible ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ de intensidad de luz) y 10 horas de oscuridad.

Material patológico

Se utilizó un aislado monospórico de *B. cinerea* (Bc-CA-06) y otro de *B. fabae* (Bf-CO-05). El aislado de *B. cinerea* se sembró en una placa Petri (9 cm de diámetro) con medio PDA (patata, dextrosa, agar) y se mantuvo a 19 °C con un ciclo de 12 horas de luz (visible + ultravioleta cercano) y 12 horas de oscuridad durante 10 días, tras los cuales una capa de micelio en esporulación cubría todas las placas. El aislado de *B. fabae* creció en las mismas condiciones, pero después de la incubación el contenido de cada placa se cortó en pequeños trozos con un bisturí. Estos trozos se incorporaron a un matraz en el que había medio V8 (270 ml de zumo V8, 30 ml de agua desionizada y 3 g de agar, a pH 5,5) esterilizado en autoclave y todavía líquido (cada placa Petri se distribuyó en dos matraces). Esta mezcla se vertió sobre placas Petri estériles y se cultivó durante 7 días en las mismas condiciones de luz y temperatura anteriores, hasta que igualmente se consiguió abundante micelio en esporulación.

Inoculación

Se obtuvo una suspensión de esporas de cada aislado vertiendo una solución de glucosa (1,2% p/v) en cada placa (10-15 ml por placa), y se liberaron las esporas haciendo pasar por la superficie de la misma un asa de siembra. Esta suspensión se filtró a través de una malla de nylon (200 micras de paso) para eliminar restos de micelio. La concentración de esporas se calculó con un hematocímetro, y se diluyó con la solución de glucosa hasta alcanzar una concentración de 1.000.000 esporas/ml. Finalmente, se añadió Tween-20 a la suspensión (0,03% v/v).

Las plantas se pulverizaron con la suspensión de esporas (aproximadamente 2,5 ml por planta). Después se llevaron a un incubador y se mantuvieron en oscuridad durante 48 horas a 20 °C y con una humedad relativa cercana al 100%. Después se transfirieron a una cámara de crecimiento con las mismas condiciones en las que habían crecido, aunque la humedad relativa se mantuvo por encima del 95%. Para ello, las macetas se colocaron en bandejas cubiertas con una estructura cerrada de plástico cuyas paredes interiores se pulverizaban diariamente con agua.

Evaluación de la respuesta a la enfermedad

Se hizo una evaluación a los dos días después de la inoculación y otra a los ocho, dando por finalizado el experimento. El parámetro evaluado fue “severidad”, entendida como el porcentaje de superficie foliar de cada planta cubierta por lesiones, con una corrección para incrementar en un 50% el peso de las lesiones en las que había esporulación:

Severidad = (% de lesiones sin esporular) + 1,5 x (% de lesiones con esporulación)

Determinación de la germinación de las esporas de Botrytis spp.

La germinación de las esporas de los patógenos se determinó a nivel microscópico. Las muestras se tomaron a dos tiempos diferentes: 24 y 48 horas tras la inoculación. Se cortó una hoja completa de cada planta, se separaron sus tres folíolos, y se fijaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo descrito en Rubiales y Moral (2004). Se observaron un mínimo de 100 esporas por foliolo, contando aquéllas con tubo germinativo y aquéllas sin él, y se calculó la proporción correspondiente. La observación de las esporas se realizó con un aumento de x100.

Análisis estadístico

Para los cálculos estadísticos se empleó el programa Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EE.UU.). Se llevaron a cabo análisis de varianza (con genotipo y patógeno como factores fijos) para los parámetros estudiados (severidad y porcentaje de germinación) a los diferentes tiempos. Los datos se transformaron mediante la transformación arcoseno cuando se consideró conveniente. Las medias se separaron mediante una prueba LSD ($p = 0,05$).

Estudio del perfil de expresión génica de los factores de transcripción

Se llevó a cabo un estudio a gran escala del perfil de los factores de transcripción involucrados en la interacción *M. truncatula* / *Botrytis* spp. Los genotipos evaluados fueron A17 y Esp162. Se aplicaron tres tratamientos diferentes a seis plantas de cada genotipo (tres repeticiones por tratamiento, dos plantas por repetición): (1) inoculación con un aislado de *B. fabae*; (2) inoculación con un aislado de *B. cinerea* y (3) control, sin inoculación.

Material vegetal, inoculación y recogida de muestras

El material vegetal y los patógenos se manejaron del mismo modo que se ha descrito para el ensayo de evaluación frente a la enfermedad. A las plantas

no inoculadas se les pulverizó también la solución de glucosa con Tween-20. La recogida de muestras se realizó 48 horas después de la inoculación. Se cortaron todas las hojas de cada grupo de seis plantas sometidas al mismo tratamiento y se mezclaron de modo que constituyesen una muestra individual. Cada una de estas muestras se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C.

Extracción del ARN total y síntesis del ADNc

El ARN total se extrajo con TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La integridad se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa (2% p/p) en condiciones de desnaturalización, y la concentración y la calidad se determinaron mediante espectrofotómetro. Para eliminar cualquier resto de ADN genómico presente en las muestras, se tomaron 200 µg de ARN total y se trataron con el kit *RNAse free DNase RQ ITM* (Promega, Madison, USA); tras este tratamiento, la integridad, la concentración y la calidad se determinaron de nuevo. Se emplearon cebadores específicos para el gen de ubiquitina de *M. truncatula* para confirmar que no quedaba ADN genómico (Kakar et al., 2008). Se sintetizó ADN complementario (ADNc) de cadena simple usando la transcriptasa *SuperScriptTM III reverse transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

PCR en tiempo real

Se empleó una colección de parejas de cebadores correspondientes a 1.084 factores de transcripción putativos (Kakar et al., 2008). Las reacciones PCR se llevaron a cabo como se describe en Kakar et al. (2008) en una placa óptica de 384 pocillos con un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); para el seguimiento de la síntesis de ADN de cadena sencilla se usó SYBR® Green. Se emplearon cuatro genes control (*MtUbi*, *MtGapdh*, *MtPdf2*, *MtEfl*) repetidos dos veces en cada placa.

Análisis de datos

Para analizar los datos se utilizó el programa informático SDS 2.0 (Applied Biosystems). Los valores de Cq fueron aquellos que se correspondían con un umbral de fluorescencia de 0,3. Se descartaron aquellas reacciones de amplificación en las que se obtuvo más de una curva de disociación. La eficiencia de la PCR se determinó mediante el programa LinReg (Ramakers et al., 2003), eliminándose del análisis aquellas reacciones cuyas eficiencias fueron inferiores a 1,6. El programa *Bestkeeper* (Pfaffl et al., 2004) permitió identificar a los genes de referencia más estables, que fueron escogidos para los cálculos posteriores.

El valor de la expresión génica se calculó mediante la expresión E^{Cq} . Se definió un índice de normalización para cada placa como la media geométrica de los valores de expresión de los genes de referencia en esa placa; el nivel de expresión de cada gen se normalizó dividiendo los valores de expresión entre ese índice. Por último, se llevaron a cabo análisis de varianza para estos valores de expresión normalizados; los factores fueron genotipo y patógeno (con tres niveles: inoculación con *B. fabae*, inoculación con *B. cinerea*, y sin inoculación). Las medias se separaron mediante tests LSD ($p = 0,05$). Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, EE.UU.).

Aquellos FTs que presentaban diferencias significativas sólo para el factor patógeno se clasificaron de acuerdo con un análisis de conglomerados de medias k. Se empleó una matriz de datos con los \log_2 de los ratios inoculado/no inoculado de los valores de expresión para obtener una matriz de distancias euclídeas. La clasificación en grupos se llevó a cabo utilizando el programa Cluster v3.0 (Eisen et al., 1998) y se representó gráficamente con el programa TreeView v1.05.

Resultados

Evaluación de los genotipos de *Medicago truncatula*

Los primeros síntomas de la infección por botritis eran visibles a las 48 horas tras la inoculación, al sacar las plantas de la incubación en oscuridad, y la severidad fue aumentando a medida que pasaban los días. El análisis de varianza para la severidad mostró efectos significativos para genotipo en ambos tiempos de evaluación, siendo A17 más resistente que Esp162 (Tablas 1 y 2). En la Figura 1 se pueden ver los síntomas de la enfermedad en el genotipo susceptible; se observan necrosis similares a las lesiones agresivas que produce *B. fabae* en *V. faba* y lesiones con esporulación. Los aislados no difirieron uno de otro en agresividad a los dos días después de la inoculación (2ddi), pero sí lo hicieron a los 8ddi. Igualmente, no se encontró interacción entre los factores genotipo y patógeno a los 2ddi, y sí la hubo a los 8ddi. Los mayores valores de severidad se dieron al inocular Esp162 con *B. fabae*. Este genotipo fue significativamente más susceptible a los dos patógenos que A17. En la Figura 2 se presentan los resultados de cada combinación de genotipo y patógeno.

Los análisis de varianza para la germinación de las esporas tanto a 24 como a 48 horas después de la inoculación encontraron diferencias significativas para el factor patógeno, no así para genotipo ni para la interacción entre ambos (Tablas 3 y 4). El índice de germinación de *B. cinerea* es mayor que el de *B. fabae* a ambos tiempos (Figura 3).

Estudio del perfil de expresión génica de los factores de transcripción

Se pudieron amplificar 874 de los 1084 transcritos de factores de transcripción (un 80,6%). En la Figura 4 se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación obtenidas. Tras el análisis con Bestkeeper se eligieron *MtGapdh*, *MtPdf2* y *MtEfl* como los genes de referencia, y se usaron para calcular el

índice de normalización. Tras calcular los valores de expresión normalizados, el análisis estadístico de los mismos reveló que 170 transcritos presentaban diferencias significativas sólo para el factor genotipo (Tabla 5), 126 para patógeno (Tabla 6) y 37 tanto para genotipo como para patógeno (Tabla 7). En la Tabla 8 se recoge información sobre las proporciones de las familias de los FTs de *M. truncatula* presentes en estos tres grupos.

Tabla 1. Análisis de varianza de los efectos de genotipo (A17 y Esp162) y patógeno (*B. fabae* y *B. cinerea*) sobre la severidad dos días después de que las plantas fuesen inoculadas (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	291652	291652
Patógeno	1	2565	2565
Genotipo * Patógeno	1	2346	2346
Error	48	136359	2841
Total	52		

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

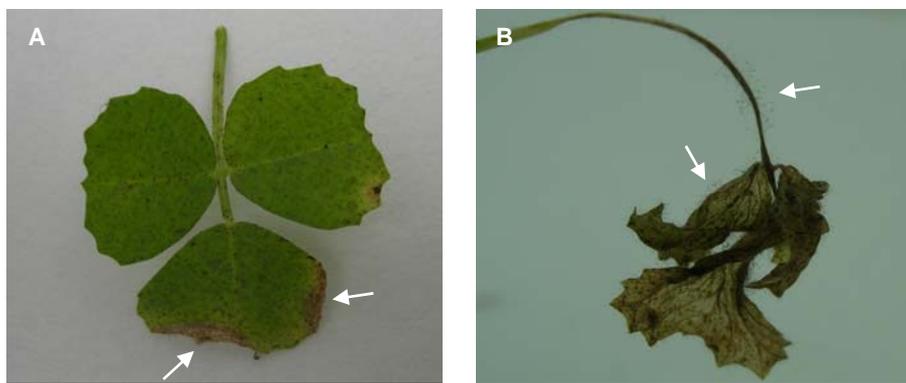
Tabla 2. Análisis de varianza de los efectos de genotipo (A17 y Esp162) y patógeno (*B. fabae* y *B. cinerea*) sobre la severidad ocho días después de que las plantas fuesen inoculadas (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	10614,2	10614,2***
Patógeno	1	4873,8	4873,8**
Genotipo * Patógeno	1	2794,0	2794,0*
Error	46	13692,4	297,7
Total	50		

***, ** y * indican efectos significativos a 0,0001, 0,001 y 0,01 niveles de probabilidad, respectivamente

Se realizó un análisis de conglomerados mediante el método de las medias k con los 126 genes que mostraban diferencias para el factor patógeno, lo que llevó a su clasificación en siete grupos diferentes (Figura 5). Estos

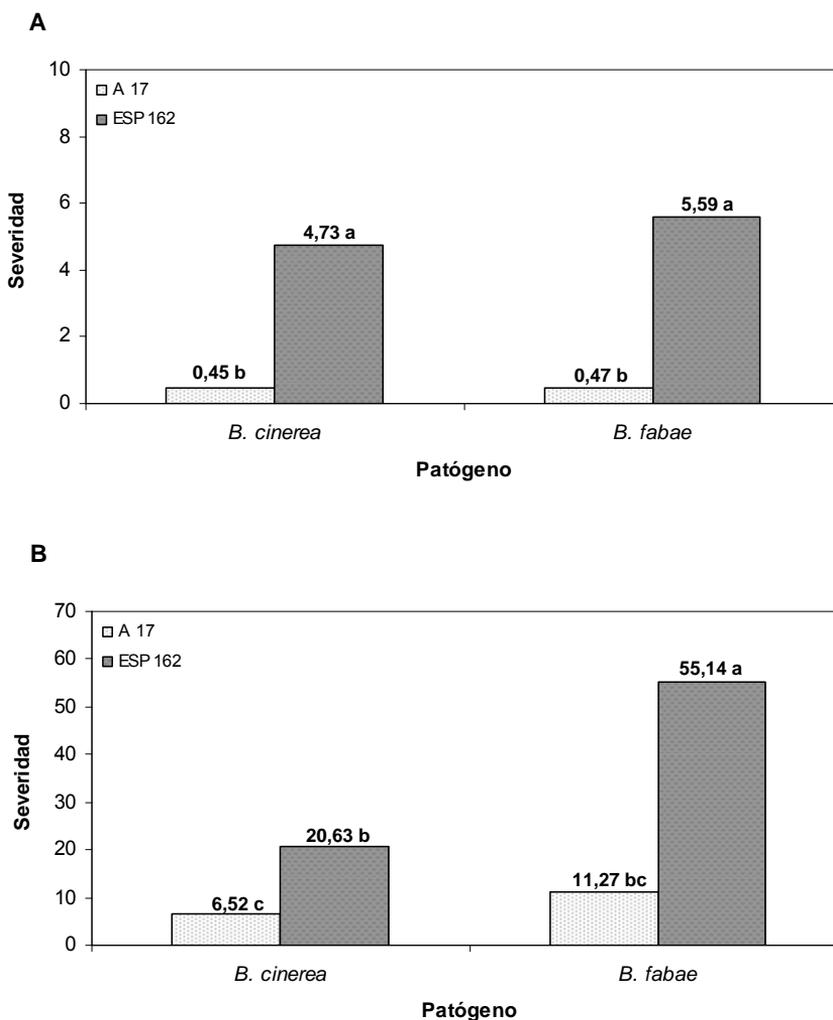
Figura 1. Hojas del genotipo Esp162 de *M. truncatula* infectadas por *B. fabae*. A: hoja con abundantes lesiones; las flechas blancas señalan zonas necróticas, similares a las lesiones agresivas que provoca este patógeno en *V. faba*. B: hoja completamente necrótica, las flechas señalan zonas donde se observan conidióforos del patógeno.



grupos se corresponden con diferentes patrones de respuesta a la inoculación con los patógenos. Los grupos 1 y 5 contienen aquellos FTs que se inhiben tras la inoculación, sin diferencias entre patógenos (siendo la inhibición mayor en el grupo 1 que en el 5); en el grupo 2, por el contrario, están los FTs cuya expresión aumenta después de la inoculación con cualquiera de los dos patógenos, y en el grupo 3 aquellos en las que sólo aumenta al inocular con *B. fabae*; el grupo 4 incluye a los FTs que sufren mayor inhibición al ser inoculados con *B. fabae* que con *B. cinerea*; el grupo 6 reúne los FTs en los que disminuye la expresión con la infección por *B. cinerea*, y el 7 aquellos en los que sucede lo contrario, es decir, que se inhiben con *B. fabae*. Estos diferentes comportamientos están representados en la Figura 4. En cuanto a la distribución por familias, en el grupo 2 hay tres genes que pertenecen a la familia de dedos de Zn (tipo C_2H_2), dos que pertenecen a la familia WRKY, uno a la familia

AP2/EREBP, uno a la BHLH y otro a la familia semejante a HD; en el grupo 3 se encuentran, entre otros, cinco genes AP2/EREBP, cuatro MYB, dos dedos de Zn (uno del tipo C₂H₂ y otro del tipo semejante a CO), uno GRAS y otro NAC; en el grupo 4 hay cinco AP2/EREBP, dos Myb, dos BHLH, un dedo de Zn (del

Figura 2. Valores de severidad para los dos genotipos de *M. truncatula* (A17 y Esp 162) a los dos (A) y a los ocho días (B) tras la inoculación con *B. cinerea* o *B. fabae*. Los valores que presentan la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD para datos transformados mediante la expresión $\arcsen \sqrt{x}$; $p < 0,05$).



tipo YABBY), un bZIP, un PHD y un TCP; finalmente, los grupos 1, 6 y 7 están constituidos por FTs pertenecientes a diferentes familias, no destacando ninguna de ellas en particular.

Tabla 3. Análisis de varianza de los efectos de genotipo (A17 y Esp162) y patógeno (*B. fabae* y *B. cinerea*) sobre la germinación de las esporas 24 horas después de que las plantas fuesen inoculadas (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	8,27	8,27
Patógeno	1	8561,09	8561,09***
Genotipo * Patógeno	1	4,15	4,15
Error	8	442,72	55,34
Total	11		

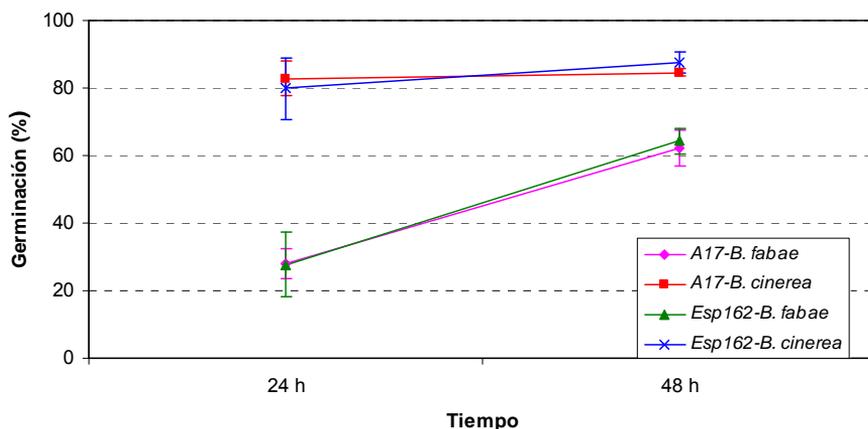
*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

Tabla 4. Análisis de varianza de los efectos de genotipo (A17 y Esp162) y patógeno (*B. fabae* y *B. cinerea*) sobre la germinación de las esporas 48 horas después de que las plantas fuesen inoculadas (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	1	16,36	16,36
Patógeno	1	1389,08	1389,08***
Genotipo * Patógeno	1	0,39	0,39
Error	7	107,79	15,40
Total	10		

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

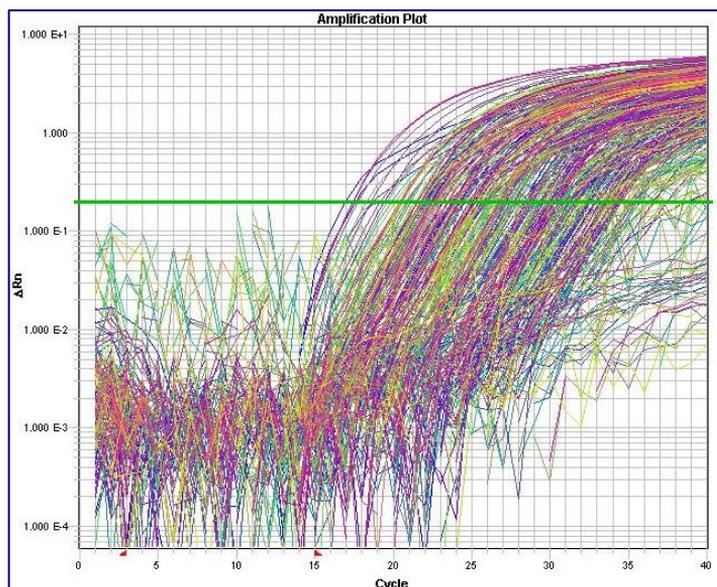
Figura 3. Valores de germinación de las esporas de *B. fabae* y de *B. cinerea* sobre dos genotipos de *M. truncatula* (A17 y Esp162) a las 24 y las 48 horas después de la inoculación. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.



Discusión

En este trabajo hemos estudiado la interacción entre *M. truncatula* y dos importantes patógenos de leguminosas a nivel de transcripción. *M. truncatula* no es un huésped natural de estos hongos, y aunque los procedimientos para conseguir la infección en condiciones controladas ya han sido descritos con anterioridad (Ellwood et al., 2007) hasta ahora no se conocía ninguna diferencia genotípica en la respuesta de *M. truncatula* a *Botrytis* spp. Nosotros hemos identificado un genotipo de *M. truncatula* (A17) que puede clasificarse como parcialmente resistente y otro (Esp 162) como susceptible a *Botrytis* spp. en las condiciones descritas. Es de reseñar que *B. fabae* ha resultado ser más agresivo que *B. cinerea*. El primero es un patógeno específico de unas pocas especies de la familia *Fabaceae*, principalmente de *V. faba* (Staats et al., 2005), mientras que el segundo es un patógeno de amplio espectro, responsable de enfermedades en leguminosas como *Lens culinaris* y *Medicago sativa* (Tivoli et al., 2006; Williamson et al., 2007), sin llegar a

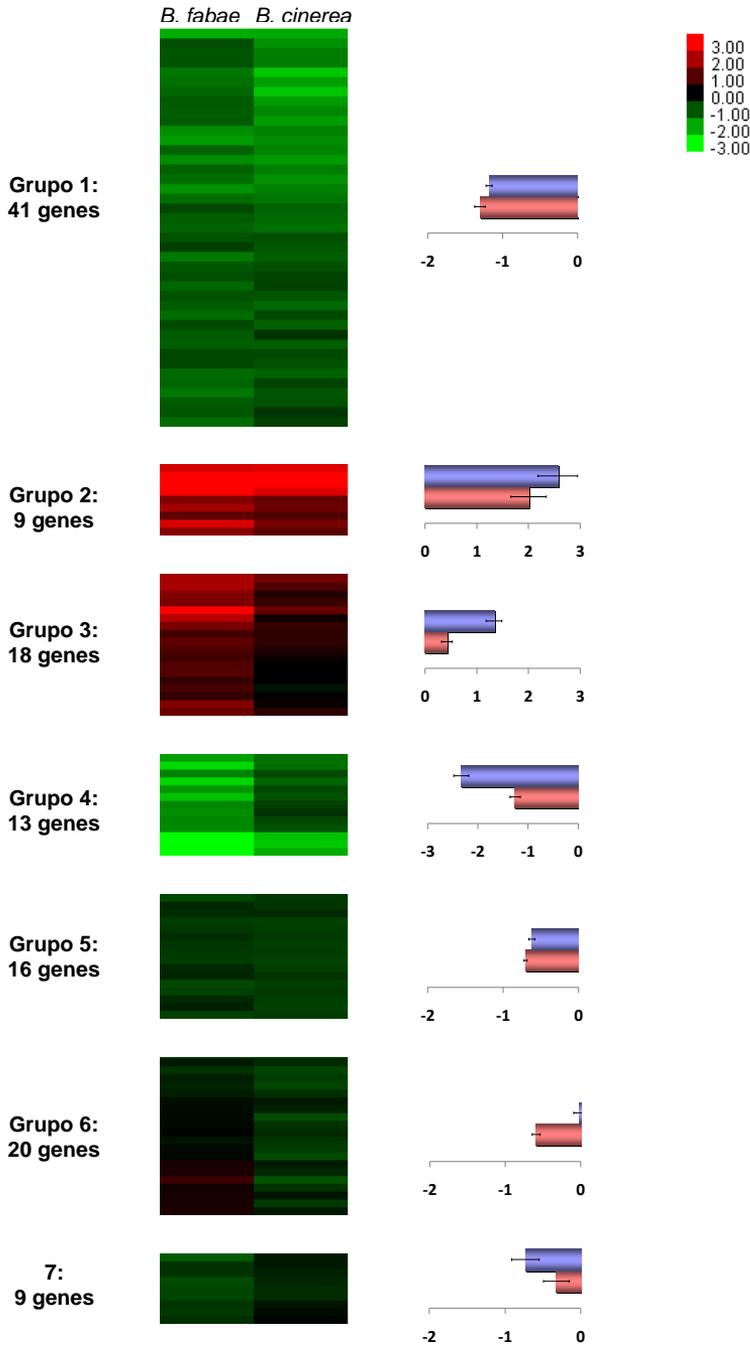
Figura 4. Curvas de amplificación mediante qPCR de 384 genes de factores de transcripción de *M. truncatula*, tal y como las presenta el programa SDS 2.0.



suponer una amenaza seria para *V. faba*. El comportamiento de *M. truncatula*, por tanto, se parece más al de *V. faba* que el de otras leguminosas en el caso de estos patógenos, de modo que se puede considerar como una buena planta modelo para el estudio del patosistema *V. faba* / *Botrytis* spp.

Los estudios de microscopía han mostrado que las esporas de *B. cinerea* muestran ya el máximo nivel de germinación a las 24 horas tras la inoculación; las de *B. fabae* necesitan más tiempo para germinar, y siempre mantienen un índice de germinación inferior al de *B. cinerea* en los tiempos que hemos estudiado. Esto podría explicar los valores de severidad similares que se observan para ambos patógenos 24 horas después de la inoculación; a las 48 horas, sin embargo, cuando el número de esporas germinadas de *B. fabae* ha aumentado, este patógeno resulta ser el más agresivo.

Figura 5. Diagrama de intensidades de los perfiles de expresión (\log_2 de los ratios inoculado/no inoculado) de los factores de transcripción que presentaron diferencias significativas para patógeno, separados en los grupos obtenidos mediante al análisis de conglomerados de medias k. Se muestra la escala de color: verde para inhibición, rojo para sobreexpresión y negro para valores cercanos a 0. El número de genes de cada grupo aparece a su izquierda. La media de los ratios de cada grupo se representa a su derecha, siendo la barra azul para *B. fabae* y la roja para *B. cinerea*.



La disponibilidad de este material biológico ha permitido orientar nuestro trabajo hacia la consecución de dos objetivos: por un lado, la identificación de genes de *M. truncatula* involucrados en el proceso de infección de *Botrytis* spp., haciendo hincapié en las reacciones específicas a cada uno de los patógenos, que han resultado tan diferentes en su agresividad; por otro lado, la identificación de los factores de transcripción que caracterizan la respuesta diferencial de los genotipos frente a cada patógeno. El momento para la recogida de las muestras se escogió basándose en la información microscópica y macroscópica, considerando que a las 24 horas tras la inoculación la infección acaba de comenzar, y la planta estará reaccionando frente a ella.

Casi el 20% de los 874 genes amplificados cambiaron sus niveles de expresión después de la infección con *B. fabae* o con *B. cinerea* (37 de los cuales mostraron diferencias tanto para genotipo como para el patógeno, y 136 lo hicieron sólo para el patógeno, independientemente del genotipo). Esta proporción es mayor que la que encontraron Madrid et al. (2010) en el caso de *Uromyces striatus* J. Schröt (en el que es el único estudio hasta la fecha que ha hecho uso de la plataforma de factores de transcripción de *M. truncatula* para estudiar la respuesta a infecciones fúngicas) que fue del 13%. Podemos formular la hipótesis de que esta diferencia es debida en parte al hecho de que *B. fabae* y *B. cinerea* son patógenos necrotrofos que penetran rápidamente en el interior del tejido vegetal, creciendo dentro de él y matando las células de la planta para alimentarse de ellas, mientras que *U. striatus* es un hongo biotrofo que requiere más tiempo para expandirse por dentro de la planta y causarle daño, de ahí la mayor alteración fisiológica al comienzo de la infección por *Botrytis* spp.

El análisis de conglomerados ha permitido agrupar los FTs que han respondido de diferente modo a la infección. La mayoría de ellos experimentan una disminución de la expresión (99 FTs de los 126 encontrados, 57 de ellos

independientemente del patógeno). Estos factores de transcripción son de muy diferentes tipos y pertenecen a diferentes familias, y aunque su inhibición podría deberse a una perturbación de los procesos biológicos por el patógeno, también es cierto que la reducción de la expresión puede ser una parte integral de la respuesta defensiva por parte de las plantas (Bustos et al., 2010). Será necesario llevar a cabo más estudios para esclarecer esta cuestión, y establecer el papel de cada uno de estos FTs en estas circunstancias. Por lo que se refiere a los 9 genes sobreexpresados tras la infección con cualquiera de los dos patógenos, 6 de ellos pertenecen a familias que se han relacionado con la respuesta al estrés: AP2/EREBP, que es una familia exclusiva de las plantas, caracterizada por contener el dominio de unión al ADN AP2 y que se ha vinculado con la respuesta a estreses tanto abióticos como bióticos (Dietz et al., 2010); C₂H₂ (proteínas de dedo de Zn del tipo Cys₂/His₂), que han sido relacionadas con la respuesta a diferentes estreses, igualmente bióticos y abióticos (Kielbowicz-Matuk, 2012); y WRKY, una familia también propia de las plantas, y cuyos miembros han sido descritos como constituyentes de una “red de reguladores de la defensa” contra patógenos (Eulgem, 2006). Estos genes podrían constituir el núcleo de la reacción defensiva de *M. truncatula* a la infección por botritis.

De especial interés es la respuesta diferencial según el patógeno sea *B. fabae* o *B. cinerea*. Aparte de los 9 genes arriba mencionados, cuando la infección es causada por *B. fabae* hay 18 genes que incrementan sus niveles de expresión. Encontramos de nuevo entre ellos a genes que pertenecen a familias relacionadas con el estrés: AP2/EREBP y C₂H₂, como hemos visto más arriba; GRAS, una familia de proteínas que aunque no se les conoce una unión directa al ADN se las clasifica como reguladores de la transcripción, y que alguna de ellas ha sido considerada esencial para la activación de los promotores que se inducen por el estrés (Fode et al., 2008); NAC, que resulta clave en la regulación de la percepción del estrés (Jensen et al., 2010); y Myb (uno de ellos del tipo semejante a homeodominio), una familia que está ampliamente

representada en las plantas y a cuyos miembros se han asignado muchos papeles, en algunos casos relacionados con la regulación de la defensa (Dubos et al., 2010). Todo esto indica un aumento de las respuestas defensivas en *M. truncatula* cuando se confronta con *B. fabae* en vez de con *B. cinerea*. Nuestros resultados muestran que *B. fabae* es más agresivo que *B. cinerea*, así que podemos suponer que la planta desencadena mecanismos de defensa adicionales para hacer frente a un oponente de más entidad. Todo esto es incluso más notable cuando se considera que a las 24 horas tras la inoculación hay más esporas germinadas de *B. cinerea* que de *B. fabae*, así que el número de puntos de infección es en principio mayor para el primero; sin embargo, parece que la planta reconoce en *B. fabae* un enemigo más peligroso incluso en estos primeros momentos de la infección. En el caso de sistema patogénico *Vicia faba* / *Botrytis* spp., se ha sugerido que *B. fabae* es más agresivo que *B. cinerea* porque es capaz de metabolizar el ácido wyerónico, que es la fitoalexina que produce la planta (Harrison, 1988). Podemos formular la hipótesis que algo similar podría suceder en el caso de *M. truncatula* / *Botrytis* spp., y que por eso la planta necesitaría recurrir a mecanismos adicionales de defensa en el intento de detener la infección. Finalmente, también es digna de mención la existencia de genes cuya expresión disminuye o no dependiendo de cuál es el patógeno (20 para *B. cinerea*, 9 para *B. fabae*). Como sucedía antes, es difícil decir si esto es también parte del sistema de defensa, o si refleja la obstaculización por cada patógeno de procesos fisiológicos diferentes. Estos resultados ponen de manifiesto que a las 24 horas después de la inoculación, aunque macroscópicamente no se aprecian diferencias, a nivel molecular la interacción planta-patógeno es específica para cada especie de *Botrytis*, y anticipa la diversidad en las reacciones que resulta patente algunos días más tarde, cuando la diferencia en la agresividad de cada patógeno es notoria.

Por lo que se refiere a la respuesta diferencial de los genotipos frente a la infección, es destacable que la mayoría de los genes que presentan diferentes comportamientos tanto para genotipo como para patógeno experimenten un

descenso de la expresión. Aunque determinar si esta inhibición es parte de una reacción defensiva es un asunto complejo, hay algunos casos que parecen señalar en esa dirección: los factores de transcripción 1443.m00022, 1699.m00013 y 939.m00019 están todos inhibidos tras la infección en el genotipo resistente A17, mientras que se encuentran sobreexpresados en el susceptible Esp162. Lo mismo podría decirse de otros genes como 980.m00009 o 989.m00004, que muestran niveles de expresión menores en A17 sin inocular que en Esp162 sin inocular, y experimentan mayor inhibición en A17 tras la inoculación con los dos patógenos; en este caso la expresión reducida parece estar también relacionada con una respuesta defensiva más efectiva. Por el contrario, hay algunos genes que, a pesar de disminuir su expresión, tienen niveles superiores de expresión en A17 infectado que en Esp162 infectado. Podemos suponer que en este caso el descenso de expresión es consecuencia de un malfuncionamiento debido a la presencia del patógeno, y que el genotipo resistente ha conseguido mitigar este efecto. Por otra parte, sólo tres genes están sobreexpresados, dos tanto para la infección con *B. fabae* como con *B. cinerea* (1103.m00014 y 1323.m00024), y uno exclusivamente para *B. fabae* (1524.m00006). Todos ellos alcanzan después de la inoculación niveles de expresión superiores en A17 que en Esp162, de modo que podemos suponer que forman parte de la reacción de defensa contra *Botrytis* spp. en el genotipo resistente.

Aparte de estas respuestas inducidas por la infección, deberíamos también considerar las defensas constitutivas. *M. truncatula* presenta en principio resistencia de tipo no-huésped a *Botrytis* spp. y, aunque hemos logrado superarla y conseguir la infección, es probable que la reacción resistente de A17 esté en gran medida basada en ese tipo de resistencia. Generalmente se acepta que la resistencia no-huésped consta de dos componentes: resistencia inducida y resistencia constitutiva. Esta última está basada en una variada serie de elementos, que abarcan desde las defensas estructurales (por ejemplo, las barreras físicas) hasta proteínas o metabolitos

inhibidores (Ferreira et al., 2006). Hemos encontrado un gran número de FTs (170) que presentan diferencias constitutivas entre los dos genotipos, independientemente de la inoculación con los patógenos. Este resultado contrasta con el de Madrid et al. (2010), quienes sólo describieron 9 FTs con diferencias constitutivas entre los genotipos evaluados, lo que sugiere que los genotipos que hemos seleccionado para nuestro trabajo difieren grandemente uno del otro. Es probable que alguno de estos 170 FTs estén involucrados en la resistencia constitutiva a la infección. Entre ellos hay miembros de familias que han sido relacionadas con la resistencia en plantas, tales como C₂H₂, AP2/EREBP, WRKY o NAC; esta última ha sido descrita como participante en la resistencia no-huésped (Uma et al., 2011).

Finalmente, resulta de interés comprobar que sólo 2 de los 13 genes relacionados con la defensa señalados por Madrid et al. (2010) han resultado también influidos por la infección en nuestros resultados. El factor de transcripción 1082.m00015 está sobreexpresado en la respuesta resistente a *U. striatus*, mientras que 1063.m00010 está inhibido. El comportamiento de estos dos genes es bastante similar en nuestro caso, dado que 1082.m00015 está sobreexpresado y 1063.m00010 inhibido después de la inoculación tanto como *B. fabae* como con *B. cinerea* (sin diferencias entre los genotipos). En cualquier caso, no es sorprendente que la mayoría de los genes implicados en las reacciones a cada una de las enfermedades no sean los mismos: los sistemas estudiados son muy diferentes, tanto por el tipo de patógeno como por los genotipos de *M. truncatula* empleados (A17 es susceptible a *U. striatus* y sin embargo presenta resistencia a *Botrytis* spp.).

Como conclusión, podemos afirmar que con este trabajo se ha establecido un sistema para el estudio de las interacciones entre *Medicago truncatula* y *Botrytis* spp. que puede servir como modelo para el sistema patogénico *Vicia faba* / *Botrytis* spp. El análisis de los factores de transcripción ha permitido identificar, por un lado, aquellos involucrados en las respuestas

diferenciales a *B. fabae* y a *B. cinerea* y, por otro lado, aquellos que participan en la resistencia a estos patógenos. El trabajo futuro debería encaminarse a asignar un papel más definido a cada uno de estos FTs, describiendo e integrando las rutas metabólicas en las que pueden tomar parte, y complementando estos resultados con los de estudios patológicos y moleculares adicionales. Esto aumentaría el conocimiento funcional del genoma de *M. truncatula*, y también resultaría de interés para los programas de mejora de *V. faba* frente a botritis.

Tabla 5. Factores de transcripción cuyos valores de expresión han presentado diferencias significativas para genotipo independientemente de la inoculación con *Botrytis* spp. Se indica la pertenencia a las diferentes familias de factores de transcripción de *Medicago truncatula* y se muestran los ratios entre los valores del genotipo resistente A17 y el susceptible Esp162. (ID: número de identificación para cada factor de transcripción; S-HD: semejante a HD; S-nin: semejante a nin).

ID	Familia	Ratio A17/Esp162	ID	Familia	Ratio A17/Esp162
1000.m00002	WRKY	0,22	1468.m00014	bzip	7,22
1002.m00007	Myb	37,44	1475.m00009	FHA	1,77
1011.m00003	S-HD	1,90	1511.m00011	NAC	4,53
1013.m00007	HB	0,44	1513.m00017	Myb	1,75
1023.m00007	Jumonji	1,41	1542.m00002	AS2	0,26
1024.m00027	HB	1,94	1581.m00005	AS2	0,50
1028.m00006	TCoA	0,36	1648.m00026	RR	0,09
1038.m00022	A20-like	0,67	1649.m00029	S-HD	0,34
1039.m00012	Myb	12,53	1650.m00019	C2H2	11,82
1041.m00008	PHD	1,93	1671.m00014	S-HD	0,22
1044.m00008	PHD	1,61	1699.m00022	C2H2	0,31
1046.m00024	CCHC(Zn)	0,09	1701.m00007	C2C2-DOF	0,24
1047.m00030	CCHC (Zn)	10,43	1707.m00003	SBP	0,22
1056.m00017	Jumonji	2,00	1713.m00026	AP2/EREBP	1,33
1072.m00006	Jumonji	2,11	1735.m00007	EIL	0,10
1078.m00009	S-HD	2,79	1739.m00013	S-Nin	0,37
1081.m00009	NAC	1,72	1749.m00019	HB	0,69
1084.m00021	C2C2-GATA	1,99	1751.m00013	C3H	2,03
1091.m00037	Myb	1,89	207.m00221	C2C2-DOF	1,51
1100.m00023	S-HD	2,55	244.m00212	BHLH	0,40
1100.m00026	S-HD	2,81	29.m00204	SNF2	2,04
1102.m00005	AP2/EREBP	0,29	56.m00218	PHD	0,10

Tabla 5. Continuación.

ID	Familia	Ratio A17/Esp162	ID	Familia	Ratio A17/Esp162
1102.m00008	AP2/EREBP	0,29	60.m00188	ZF DHHC	6,58
1110.m00005	CCHC(Zn)	0,17	65.m00241	BHLH	0,20
1112.m00027	BHLH	0,64	659.m00130	C2H2	0,58
1113.m00023	RR	0,31	67.m00243	C2H2	16,47
1121.m00011	LRR	0,09	695.m00127	E2F-DP	0,55
1121.m00022	FHA	3,58	708.m00111	C2C2-GATA	0,74
1126.m00010	ZF DHHC	5,52	718.m00078	Myb	1,53
1129.m00001	CCHC (Zn)	6,57	722.m00030	LIM	1,40
1132.m00008	Myb	1,69	732.m00026	BZIP	0,46
1135.m00016	CCHC(Zn)	0,28	738.m00007	C2H2	1,92
114.m00223	BED-type (Zn)	0,20	738.m00008	C2H2	1,82
1144.m00031	RR	0,25	748.m00017	NAC	0,76
1147.m00003	C3H	1,96	749.m00145	PHD	1,54
1159.m00003	S-HD	0,51	751.m00012	HB	1,89
1160.m00016	CCHC (Zn)	1070,41	754.m00011	Myb	2,33
1164.m00013	SNF2	1,70	766.m00007	HMG	1,88
1170.m00006	C2C2-GATA	0,75	773.m00017	Myb	3,71
1171.m00012	FHA	6,97	779.m00009	Myb	0,04
1183.m00014	CCHC(Zn)	0,24	779.m00013	Myb	0,17
1183.m00022	CCHC(Zn)	0,07	779.m00168	Myb	2,40
1189.m00012	ARF	1,30	781.m00010	EIL	0,21
1207.m00016	AP2/EREBP	0,32	791.m00025	Myb	3,12
1207.m00019	AP2/EREBP	0,13	803.m00030	CAMTA	1,62
1207.m00022	AP2/EREBP	0,17	806.m00078	Myb	1,50
1210.m00004	ABI3-VP1	1,53	812.m00007	Myb	2,66
1215.m00017	NAC	3,58	814.m00011	ARF	1,89
1232.m00009	S-HD	1,85	819.m00022	CCHC(Zn)	0,23
1242.m00012	S-HD	1,58	822.m00026	Lambda-DB	0,55
1244.m00028	DDT	1,48	822.m00032	HMG	1,86
1246.m00001	CCHC (Zn)	2,04	824.m00011	Myb	0,16
1249.m00020	RR	2,89	833.m00018	CCHC (Zn)	1,86
1253.m00007	WD-40	1,84	833.m00024	CCHC (Zn)	3,28
1258.m00007	Myb	0,53	843.m00018	Jumonji	2,15
1272.m00013	SNF2	1,66	850.m00002	PHD	1,62
1284.m00009	Myb	1,75	860.m00001	BD	22,06
1287.m00031	WRKY	2,18	872.m00014	SNF2	1,71
1295.m00011	CCHC(Zn)	0,19	881.m00004	HTH-FIS	0,37
1298.m00006	CCHC (Zn)	8,15	888.m00029	CCHC (Zn)	2,74
1320.m00015	CCHC (Zn)	6,83	893.m00003	PHD	1,61

Tabla 5. Continuación.

ID	Familia	Ratio A17/Esp162	ID	Familia	Ratio A17/Esp162
1327.m00014	C2H2	2,06	896.m00014	SBP	1,73
1337.m00001	ARF	0,04	897.m00019	WRKY	1,51
1340.m00029	PHD	1,88	899.m00002	Myb	2,07
1342.m00021	BZIP	0,03	899.m00016	Myb	0,70
135.m00197	GRAS	1,61	900.m00018	PHD	1,42
1372.m00012	ARF	1,61	902.m00019	E2F-DP	0,63
1373.m00004	CCHC (Zn)	2,19	904.m00009	HB	0,25
1388.m00003	bzip	3,93	904.m00024	HMG	446,00
1390.m00010	HTH-FIS	0,35	905.m00015	GRAS	1,69
1394.m00001	CCHC(Zn)	0,10	910.m00020	CCAAT	3,08
1395.m00011	WRKY	1,48	913.m00005	C2C2-DOF	0,21
1400.m00008	Myb	4,52	913.m00020	C3H	2,30
1404.m00027	S-HD	2,01	916.m00001	CCHC (Zn)	9,59
1407.m00022	AP2/EREBP	0,69	920.m00011	WRKY	0,64
1422.m00009	Myb	0,21	920.m00017	WRKY	0,41
1422.m00015	Myb	0,17	933.m00022	PHD	1,42
1423.m00005	HTH-FIS	0,36	933.m00025	C2H2	1,56
1431.m00018	LIM	2,73	935.m00020	CCHC (Zn)	1,55
1433.m00032	S-HD	0,04	951.m00007	S-HD	2,16
1438.m00005	WRKY	0,47	953.m00014	HB	19,85
1440.m00003	Jumonji	0,24	957.m00005	AP2/EREBP	4,58
1440.m00004	Jumonji	1,84	963.m00015	S-HD	2,43
1459.m00021	WRKY	1,51	969.m00019	NAC	1,78
1463.m00027	BHLH	0,66	972.m00001	bzip	1,34

Tabla 6. Factores de transcripción cuyos valores de expresión han presentado diferencias significativas para patógeno después de la inoculación con *Botrytis* spp. Se indica la pertenencia a las diferentes familias de factores de transcripción de *Medicago truncatula* y se muestran los ratios entre los valores al inocular con cada patógeno y los valores sin inocular. (ID: número de identificación para cada factor de transcripción; Bf: inoculado con *B. fabae*; Bc: inoculado con *B. cinerea*; ni: no inoculado; S-HD: semejante a HD; S-Alfin: semejante a Alfin).

ID	Familia	Ratio Bf/ni	Ratio Bc/ni	ID	Familia	Ratio Bf/ni	Ratio Bc/ni
1021.m00009	C ₂ H ₂ (Zn)	0,69	0,62	1568.m00029	FHA	1,19	0,85
1027.m00015	DHHC (Zn)	0,64	0,60	1578.m00016	S-Alfin/ dedo PHD	0,86	0,65
1042.m00016	bZIP	0,52	0,50	1579.m00028	AP2/ EREBP	0,10	0,21
1062.m00002	HTH	0,79	0,68	1581.m00019	GRAS	7,86	2,31
1063.m00010	Myb/ S-HD	0,32	0,35	1582.m00017	ABI3-VP1	0,56	0,51
1064.m00002	MADS	0,93	0,53	1582.m00018	ABI3-VP1	0,55	0,61
1072.m00022	DHHC (Zn)	0,61	0,58	1621.m00012	AP2/ EREBP	0,17	0,43
1074.m00017	HB	0,50	0,66	1622.m00017	HB	0,56	0,55
1082.m00015	AP2/ EREBP	2,82	2,27	1635.m00005	SBP	1,16	0,66
1088.m00004	TCP	0,53	0,31	164.m00205	GRAS	0,47	0,82
1100.m00024	S-HD	2,14	1,91	1641.m00002	ABI3-VP1	1,64	0,51
1102.m00007	AP2/ EREBP	0,31	0,67	1652.m00003	GRAS	0,47	0,66
1121.m00009	C ₂ C ₂ (Zn)	0,47	0,28	1669.m00001	BHLH	0,34	0,54
1122.m00011	bZIP	0,47	0,43	1690.m00019	HB	0,44	0,34
1123.m00023	HTH	0,81	0,70	1698.m00019	GRAS	0,48	0,51
1124.m00015	C ₂ C ₂ (Zn)	3,85	2,43	1703.m00020	HMG	0,58	0,61
1136.m00002	HMG	1,49	1,04	1712.m00017	C ₂ H ₂ (Zn)	0,75	0,57
1136.m00019	HB	0,55	0,44	1720.m00010	Myb	0,76	0,59
1143.m00015	Myb	0,69	0,71	1724.m00021	ZF-HD	0,43	0,58
1149.m00015	BHLH	0,47	0,28	1731.m00029	TCoAp15	0,72	0,61
1156.m00003	ZF/TReg	0,47	0,33	1734.m00001	Myb	0,58	0,63
1170.m00010	HB	0,60	0,58	1734.m00020	C ₂ H ₂ (Zn)	0,42	0,44
1186.m00014	BTB/POZ	0,64	0,60	192.m00189	Myb	0,06	0,24
1194.m00013	C ₂ C ₂ (Zn)	0,60	0,48	196.m00198	AP2/ EREBP	0,21	0,51
1198.m00032	Euk_TF	0,51	0,53	648.m00098	Myb	1,74	1,47
120.m00170	HB	0,56	0,63	657.m00091	bZIP	0,33	0,59
1210.m00008	ABI3-VP1	0,47	0,43	719.m00128	C ₂ H ₂ (Zn)	0,63	0,91
1220.m00003	TrpR	2,72	1,62	726.m00018	CCHC (Zn)	0,66	0,83
1220.m00016	DDT	1,79	0,85	737.m00008	Ankirina	0,57	0,69

Tabla 6. Continuación

ID	Familia	Ratio Bf/ni	Ratio Bc/ni	ID	Familia	Ratio Bf/ni	Ratio Bc/ni
1222.m00001	BHLH	5,66	6,21	747.m00011	WRKY	13,10	6,06
1228.m00005	C ₂ H ₂ (Zn)	0,68	0,96	749.m00018	AP2/ EREBP	1,71	1,13
1235.m00005	HB	0,57	0,70	751.m00006	BHLH	0,27	0,40
1240.m00018	bZIP	0,67	0,76	762.m00010	DHHC (Zn)	0,97	0,72
1243.m00018	AP2/ EREBP	2,93	1,36	769.m00005	C ₂ C ₂ (Zn)	0,50	0,52
1254.m00006	Myb	1,90	1,30	780.m00021	C ₂ H ₂ (Zn)	15,70	10,96
1269.m00032	TCP	0,90	0,83	780.m00022	C ₂ H ₂ (Zn)	3,97	2,55
1270.m00015	WRKY	0,92	0,76	790.m00017	LIM	0,44	0,60
1272.m00023	Myb	0,93	0,67	807.m00012	DHHC (Zn)	0,54	0,73
1292.m00014	Myb/ S-HD	0,49	0,36	808.m00017	Myb/ S-HD	3,96	1,89
1319.m00021	TCP	0,17	0,40	812.m00002	C ₂ C ₂ (Zn)	2,15	1,48
1321.m00034	GRAS	0,41	0,38	821.m00017	C ₂ H ₂ (Zn)	0,44	0,40
1334.m00024	ssDB TR	0,53	0,58	824.m00010	Myb	0,37	0,46
1360.m00022	BTB/ POZ	0,43	0,20	832.m00028	S-U1 (Zn)	0,72	0,65
1365.m00026	HB	0,65	0,84	835.m00002	Jumonji	0,24	0,25
1373.m00011	TAZ	1,22	0,62	838.m00014	ARID	0,42	0,59
1376.m00015	AS2	0,30	0,35	845.m00016	C ₂ C ₂ (Zn)	0,78	0,61
1394.m00022	SBP	0,28	0,32	853.m00021	BHLH	0,51	0,36
1408.m00021	HMG	0,95	0,54	862.m00001	S-HD	0,38	0,20
1412.m00014	AP2/ EREBP	2,71	1,53	881.m00020	C ₂ H ₂ (Zn)	18,43	11,21
1432.m00019	AP2/ EREBP	0,29	0,55	881.m00021	C ₂ H ₂ (Zn)	5,83	2,64
1433.m00010	NAC	0,73	0,66	884.m00022	AP2/ EREBP	2,00	1,00
1435.m00023	Myb	0,47	0,47	892.m00017	bZIP	0,40	0,27
1460.m00007	AP2/ EREBP	0,41	0,31	895.m00003	RR	0,42	0,55
1463.m00024	Myb	0,73	0,60	896.m00021	Myb CCHC	0,45	0,36
1475.m00011	NAC	0,55	0,45	904.m00019	(Zn)	0,63	0,61
1518.m00019	S-Alfin/ dedo PHD	1,26	0,82	908.m00018	PHD	0,33	0,55
1534.m00008	C ₂ C ₂ (Zn)	0,08	0,19	919.m00002	AP2/ EREBP	1,52	1,00
1546.m00001	WRKY	3,08	2,10	930.m00011	WRKY	0,67	0,57
1552.m00002	SBP	0,38	0,50	957.m00003	LFY	1,95	1,00
1554.m00004	Myb	2,40	1,43	967.m00016	R3H	1,26	0,73
1557.m00028	NAC	4,38	1,13	976.m00006	Myb	0,32	0,51
1567.m00018	Myb	2,85	1,08	985.m00005	Myb	1,22	0,80
1568.m00017	FHA	0,93	0,62	993.m00001	RR	0,32	0,29

Tabla 7. Factores de transcripción cuyos valores de expresión han presentado diferencias significativas tanto para genotipo como para patógeno tras la inoculación con *Botrytis* spp. Se indica la pertenencia a las diferentes familias de factores de transcripción de *Medicago truncatula* y se muestran los ratios entre los valores de cada genotipo al ser inoculado con cada patógeno y los valores sin inocular. (ID: número de identificación para cada factor de transcripción; R: genotipo resistente, A17; S: genotipo susceptible, Esp162; Bf: inoculado con *B. fabae*; Bc: inoculado con *B. cinerea*; ni: no inoculado; las barras “/” indican los ratios entre cada caso).

ID	Familia	R(ni)/S(ni)	R(Bf)/R(ni)	S(Bf)/S(ni)	R(Bc)/R(ni)	S(Bc)/S(ni)
1040.m00021	MADS	0,82	0,36	0,29	0,39	0,58
1061.m00001	MADS	0,29	0,51	0,33	0,48	0,55
1084.m00001	ARID	0,46	0,39	0,56	0,34	0,50
1103.m00014	CCHC (Zn)	12,71	3,47	1,13	3,22	0,79
1161.m00029	Tc/PD	15,71	0,62	0,88	0,61	0,96
1221.m00017	BHLH	1,77	0,13	0,05	0,23	0,27
1241.m00015	C ₂ C ₂ (Zn)	2,07	0,11	0,14	0,28	0,27
1323.m00024	S-S1Fa	0,95	6,06	3,92	3,12	1,74
1392.m00018	HMG	0,67	0,40	0,41	0,58	0,52
1405.m00027	BTB/POZ	1,43	0,46	0,44	0,59	0,68
1564.m00034	CCAAT-HAP3	0,72	0,47	0,67	0,25	0,27
1733.m00014	AS2	0,80	0,28	0,49	0,36	0,52
221.m00129	MADS	0,25	0,44	0,53	0,53	0,68
891.m00010	C ₂ C ₂ (Zn)	0,19	0,26	0,41	0,39	0,93
924.m00009	MADS	0,32	0,38	0,52	0,44	0,63
925.m00001	HLH	1,02	0,42	0,64	0,47	0,72
939.m00019	HB	0,98	0,49	1,25	0,51	1,13
956.m00012	TrpR	0,85	0,48	0,78	0,56	0,62
980.m00009	C ₂ H ₂ (Zn)	0,24	0,56	0,46	0,63	0,38
986.m00012	MADS	0,77	0,19	0,72	0,23	0,87
989.m00004	AS2	0,43	0,50	0,43	0,58	0,45
1011.m00010	NAC	2,99	0,61	0,70		
1365.m00012	Myb	0,64	0,68	0,65		
1443.m00022	NAC	1,41	0,61	1,31		
1524.m00006	Myb	3,12	1,12	2,48		
1684.m00031	Myb	1,17	0,32	0,59		
1699.m00013	C ₂ H ₂ (Zn)	1,59	0,53	1,23		
201.m00219	C ₂ C ₂ (Zn)	0,62	0,75	0,52		

Tabla 7. Continuación

ID	Familia	R(ni)/S(ni)	R(Bf)/R(ni)	S(Bf)/S(ni)	R(Bc)/R(ni)	S(Bc)/S(ni)
1325.m00003	PHD	0,82			0,41	0,69
1381.m00017	Myb	0,69			0,40	0,65
1429.m00034	C ₂ C ₂ (Zn)	0,55			0,57	0,66
1588.m00008	HB	0,50			0,54	0,71
1701.m00020	AS2	0,40			0,67	0,52
225.m00189	Myb	0,71			0,49	0,64
944.m00008	BHLH	0,81			0,52	0,68

Tabla 8. Porcentajes de los genes cuyos valores de expresión han presentado diferencias significativas para genotipo, patógeno, o ambos tras la inoculación con *Botrytis* spp., que pertenecen a las diferentes familias de factores de transcripción de *Medicago truncatula*.

Genotipo		Patógeno		Genotipo y patógeno	
Familia	%	Familia	%	Familia	%
Myb	12,94	Myb	11,90	C ₂ H ₂ (Zn)	17,14
CCHC (Zn)	11,76	AP2/EREBP	9,52	MADS	14,29
Semejante a HD	7,65	C ₂ H ₂ (Zn)	7,94	Myb	14,29
PHD	5,29	HB	6,35	AS2	8,57
AP2/EREBP	4,71	C ₂ C ₂ (Zn)	5,56	BHLH	5,71
C ₂ H ₂ (Zn)	4,71	BHLH	3,97	HB	5,71
WRKY	4,71	BZIP	3,97	NAC	5,71
HB	3,53	GRAS	3,97	CCHC	2,86
Jumonji	3,53	ABI3-VP1	3,17	PHD	2,86
BZIP	2,94	DHHC (Zn)	3,17		
NAC	2,94	WRKY	3,17		
BHLH	2,35	NAC	2,38		
ARF	2,35	HMG	2,38		
Otras	30,59	Otras	32,55	Otras	22,86

Bibliografía

- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Isabel Puga, M., Rubio, V., Perez-Perez, J., Solano, R., Leyva, A., Paz-Ares, J., 2010. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plos Genetics* 6.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant Journal* 38, 366-379.
- Dietz, K.J., Vogel, M.O., Viehhauser, A., 2010. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* 245, 3-14.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15, 573-581.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14863-14868.
- Ellwood, S., Kamphuis, L.G., Pfaff, T., Oliver, R., Samac, D., Forster-Harnett, B.D., Tivoli, B., Onfroy, C., Moussart, A., Villegas-Fernandez, A.M., Sillero, J.C., Rubiales, D., 2007. Inoculation and growth with foliar pathogenic fungi. *Medicago Handbook*.
- Eulgem, T., 2006. Dissecting the *WRKY* web of plant defense regulators. *PLoS Pathog* 2, e126.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z.J., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A.R., 2006. Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 505-524.

- Fode, B., Siemsen, T., Thurow, C., Weigel, R., Gatz, C., 2008. The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *Plant Cell* 20, 3122-3135.
- Gao, L.-L., Kamphuis, L.G., Kakar, K., Edwards, O.R., Udvardi, M.K., Singh, K.B., 2010. Identification of potential early regulators of aphid resistance in *Medicago truncatula* via transcription factor expression profiling. *New Phytologist* 186, 980-994.
- Harrison, J.G., 1988. The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease - a review. *Plant Pathology* 37, 168-201.
- Iwase, A., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., 2009. Manipulation of plant metabolic pathways by transcription factors. *Plant Biotechnology* 26, 29-38.
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., Skriver, K., 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* 426, 183-196.
- Kakar, K., Wandrey, M., Czechowski, T., Gaertner, T., Scheible, W.R., Stitt, M., Torres-Jerez, I., Xiao, Y.L., Redman, J.C., Wu, H.C., Cheung, F., Town, C.D., Udvardi, M.K., 2008. A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* 4.
- Kielbowicz-Matuk, A., 2012. Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Science* 185, 78-85.
- Madrid, E., Gil, J., Rubiales, D., Krajinski, F., Schlereth, A., Millan, T., 2010. Transcription factor profiling leading to the identification of putative transcription factors involved in the *Medicago truncatula* - *Uromyces striatus* interaction. *Theoretical and Applied Genetics* 121, 1311-1321.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and

- sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509-515.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., Moorman, A.F.M., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339, 62-66.
- Rispail, N., Kalo, P., Kiss, G.B., Ellis, T.H.N., Gallardo, K., Thompson, R.D., Prats, E., Larrainzar, E., Ladrera, R., Gonzalez, E.M., Arrese-Igor, C., Ferguson, B.J., Gresshoff, P.M., Rubiales, D., 2010. Model legumes contribute to faba bean breeding. *Field Crops Research* 115, 253-269.
- Rose, R.J., 2008. *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Functional Plant Biology* 35, 253-264.
- Rubiales, D., Moral, A., 2004. Prehaustorial resistance against alfalfa rust (*Uromyces striatus*) in *Medicago truncatula*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 239-243.
- Singh, R., Tan, S.G., Panandam, J.M., Rahman, R.A., Ooi, L.C.L., Low, E.T.L., Sharma, M., Jansen, J., Cheah, S.C., 2009. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for fatty acid composition in an interspecific cross of oil palm. *Bmc Plant Biology* 9.
- Staats, M., van Baarlen, P., van Kan, J.A.L., 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 333-346.
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W.D., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J.C., Sweetingham, M., Muehlbauer, F.J., 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223-253.
- Udvardi, M.K., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J.Y., Benedito, V., Hofer, J.M.I., Chueng, F., Town, C.D., 2007. Legume transcription factors: Global regulators of

- plant development and response to the environment. *Plant Physiology* 144, 538-549.
- Uma, B., Rani, T.S., Podile, A.R., 2011. Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology* 168, 2141-2152.
- Varshney, R.K., Close, T.J., Singh, N.K., Hoisington, D.A., Cook, D.R., 2009. Orphan legume crops enter the genomics era! *Current Opinion in Plant Biology* 12, 202-210.
- Verdier, J., Kakar, K., Gallardo, K., Le Signor, C., Aubert, G., Schlereth, A., Town, C.D., Udvardi, M.K., Thompson, R.D., 2008. Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Molecular Biology* 67, 567-580.
- Williamson, B., Tudzynsk, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561-580.
- Young, N.D., Udvardi, M., 2009. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 193-201.

Capítulo VI

**Resistencia múltiple en *Vicia faba* a botritis (*Botrytis fabae*) y roya (*Uromyces viciae-fabae*):
identificación mediante ensayos en múltiples
ambientes**

Introducción

Los cultivos sufren normalmente el ataque de diferentes patógenos a lo largo de la campaña, muchas veces simultáneamente. Lo ideal sería que las variedades cultivadas poseyeran *resistencia a múltiples enfermedades*, que se ha definido como resistencia del huésped a dos o más enfermedades (Nene, 1988). Aunque existen ejemplos de evaluaciones múltiples a distintas enfermedades (Fininsa y Tefera, 2006; Pande et al., 2006; Hussain et al., 2008; Gurung et al., 2009), la situación más común es que se realicen las evaluaciones para una sola enfermedad. Esta estrategia de “una cada vez” conlleva un empleo ineficiente de los recursos y del tiempo a la hora de obtener variedades comerciales con resistencia a múltiples enfermedades. Por un lado, hay que multiplicar el número de evaluaciones y, por otro, cuando se han identificado los genotipos adecuados, es preciso combinar genes procedentes de distintas fuentes en el mismo fondo. La reducción del número de fuentes simplificaría en gran medida todo el proceso.

Las habas no constituyen una excepción, y están expuestas a sufrir diversas enfermedades durante su ciclo de cultivo. La roya, causada por el hongo *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schröt., es una de ellas. Esta enfermedad se encuentra muy extendida en las regiones de producción de habas, siendo importante en Europa, Oriente Próximo, el norte de África y China. Suele atacar hacia el final de la temporada, cuando las vainas ya se están llenando, por lo que los componentes de rendimiento no se ven muy afectados y las pérdidas oscilan entre el 5 y el 20%. Sin embargo, si la infección se produce antes, las pérdidas pueden llegar hasta el 70% (Sillero et al., 2000).

U. viciae-fabae es un hongo biotrofo obligado. Los primeros síntomas de infección son unas manchas pequeñas redondeadas de color claro en las hojas, que posteriormente dan lugar a los uredio o pústulas (Figura 1). Éstas contienen gran cantidad de urediosporas de color marrón rojizo. La dispersión de las esporas se produce por la acción del viento fundamentalmente (Hanounik

y Bisri, 1991). Las condiciones más adecuadas para la infección son temperaturas templadas, en torno a los 20 °C, y alta humedad relativa.

Figura 1. Pústulas de roya en hoja (A) y vainas (B) de *V. faba*.



Apenas existe información sobre entradas que posean resistencia tanto a roya como a botritis: por lo que sabemos, sólo se conocen tres de esas entradas, aunque la respuesta a la infección simultánea de los dos patógenos no se ha estudiado (Sillero et al., 2010).

Un problema adicional a la hora de llevar a cabo un programa de mejora para resistencia a enfermedades es que la resistencia que se obtenga puede que no sea durable (Parlevliet, 2002). Por lo tanto, las resistencias que se empleen han de ser lo más estables que sea posible, lo que supone que las potenciales fuentes de resistencia han de ser evaluadas en diferentes ambientes y en diferentes años, como hemos visto en el capítulo 1. En el caso de la roya, no se ha publicado a fecha de hoy ningún estudio similar.

Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido:

- Seleccionar genotipos de *V. faba* con resistencia múltiple a botritis y a roya.

Materiales y métodos

La colección de germoplasma que se evaluó para resistencia a botritis (capítulo 1) fue también evaluada para su resistencia simultánea a roya. Un subconjunto de 11 entradas fueron igualmente evaluadas en dos experimentos en condiciones controladas.

Ensayos de campo

La resistencia a roya se evaluó en tres de los ensayos de campo en los que también se evaluó la respuesta a botritis: dos en Kafr El-Sheikh, Egipto (campañas 2004/2005 y 2005/2006) y uno en Córdoba, España (campaña 2005/2006). Una selección de 11 entradas se evaluó en campo en Córdoba en la campaña 2009/2010. Se empleó en todos los casos un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Se sembraron diez semillas de cada entrada en surcos de un metro separados 70 cm. Las variedades Rebaya 40 y Baraka se sembraron cada dos líneas como dispersores de las enfermedades en los ensayos de Córdoba (campañas 2005/2006 y 2009/2010, respectivamente) y el cv. Sidiqui en el caso de Kafr El-Sheikh.

Para los ensayos de Kafr El-Sheikh y el de Córdoba de la campaña 2005/2006 no se realizó inoculación de las plantas, confiando en la infección natural. Como el nivel de presión de enfermedad no fue muy elevado en el de Córdoba, se recurrió a la inoculación artificial para el ensayo de la campaña de 2009/2010. Con este fin se preparó una suspensión acuosa de urediosporas de

una población de roya que se había recogido en la zona en campañas anteriores y se había conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las urediosporas se suspendieron en agua del grifo hasta una concentración final de $250.000\text{ esporas ml}^{-1}$, añadiéndose después Tween-20 (0,03% v/v). Se pulverizaron las plantas con esta suspensión después de la puesta de sol, para aprovechar la oscuridad y la mayor humedad relativa de la noche. Se emplearon 2,3 litros de la suspensión de esporas para todo el ensayo.

La severidad de la enfermedad en cada línea se midió como el porcentaje del total de la superficie de la planta cubierto con pústulas de roya. Se realizó una única evaluación cuando las plantas estaban en el estadio fenológico de llenado de vainas.

Ensayos en planta completa en condiciones controladas

Evaluación de la resistencia a los aislados de España y de Egipto

Las 11 entradas más resistentes seleccionadas en los ensayos de campo fueron evaluadas en condiciones controladas frente a dos aislados recogidos en Córdoba y Kafr El-Sheikh. El cultivar susceptible Baraka se incluyó como control. Se emplearon 8 plantas de cada entrada (4 repeticiones para cada aislado, siendo una planta una repetición). Las plantas crecieron en macetas de 1 litro (una planta por maceta) llenas con una mezcla de arena y turba durante 18 días en una cámara de cultivo a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 14 horas de luz visible ($150\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ de intensidad de luz) y 10 horas de oscuridad.

Estas plantas se inocularon con una mezcla de urediosporas de roya (3 mg de esporas por planta) con talco puro (1:10 p/p), con la ayuda de un difusor. Cada grupo de 48 plantas (12 entradas x 4 repeticiones) se inoculó por separado con cada aislado. Las plantas se incubaron durante 24 horas en una cámara de incubación a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y con 100% de humedad relativa; después se pasaron a una cámara de crecimiento a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el mismo fotoperiodo que

durante el crecimiento. La severidad de la enfermedad se estimó visualmente en cada planta a los 13 días después de la inoculación.

Evaluación de la interacción roya-botritis

El objetivo de este ensayo era estudiar el efecto de una infección previa de botritis sobre el desarrollo de la infección por roya. Las entradas fueron las mismas que en el ensayo anterior, y se cultivaron del mismo modo. Se dividieron en dos grupos (3 repeticiones de cada entrada en cada grupo): las que se iban a inocular con *B. fabae* y las que no.

Se multiplicó un aislado monospórico de *B. fabae* (Bf-CO-05) en placas Petri (9 cm de diámetro) con medio PDA (patata, dextrosa, agar), y se incubó en oscuridad durante un día a 19 °C; luego se sometió a un ciclo de 12 horas de luz (visible + ultravioleta cercano) y 12 horas de oscuridad a la misma temperatura durante dos semanas. Después, el contenido de las placas Petri se cortó en pequeños trozos con un bisturí. Estos trozos se incorporaron a un matraz en el que había medio V8 (270 ml de zumo V8, 30 ml de agua desionizada y 3 g de agar, a pH 5,5) esterilizado en autoclave y todavía líquido. Esta mezcla se vertió sobre placas Petri estériles y se cultivó durante 7 días en las condiciones de luz y temperatura anteriores. Tras ese período, una capa de micelio en esporulación cubría todas las placas. Cuando las plantas tuvieron tres semanas, se pulverizó uno de los dos grupos de plantas con una suspensión de 300.000 esporas ml⁻¹ obtenidas a partir de las placas Petri con una solución de glucosa (1,2% v/v) con Tween 20 (0,03% v/v); se usó aproximadamente 1,5 ml por planta. El otro grupo se pulverizó con la misma solución, sin las esporas. Todas las plantas se incubaron del mismo modo que en el experimento anterior. Después las plantas se pasaron a una cámara de crecimiento a 20 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz visible (150 μmol m⁻² sec⁻¹ de intensidad de luz), y humedad relativa por encima del 90% durante seis días, hasta que los síntomas de botritis eran visibles en las plantas inoculadas; entonces la humedad relativa se bajó a alrededor del 60%. Ocho días después todas las

plantas se inocularon conjuntamente con el aislado de roya proveniente de Córdoba. La inoculación y la incubación se realizaron del mismo modo que en el ensayo anterior. La evaluación de la severidad de roya se realizó 14 días después de la inoculación.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) para los parámetros evaluados en los diferentes experimentos. Los datos de los ensayos de campo de las campañas 2004/2005 y 2005/2006 se sometieron a análisis biplot de genotipo y genotipo por ambiente (GGA) (Yan et al., 2000). El “ambiente” se definió como la combinación de una localidad y una campaña agrícola (cada ensayo en una campaña dada se consideró un ambiente independiente, Tabla 1). Se eligió un factor de escala (f) de 0,5 para llevar a cabo la descomposición singular de los datos centrados por ambiente (Yan, 2002) y para obtener los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). El eje de abscisas de la coordenada ambiental media (CAM) es la línea que une el origen del biplot y la media ambiental, es decir, la media de CP1 y CP2 en todos los ambientes. La proyección de los genotipos sobre este eje representa la contribución de cada genotipo a G, de modo que los genotipos se pueden clasificar a lo largo del mismo, en orden de severidades crecientes de izquierda a derecha. El eje de ordenadas de la CAM, por el contrario, recoge la contribución de cada genotipo a la interacción G x A, de modo que los genotipos más estables (es decir, aquellos que son más consistentes en todos los ambientes) serán aquellos con los valores más bajos (positivos o negativos) de sus proyecciones sobre el mismo. Cada ambiente está caracterizado por su vector (el segmento que lo une con el origen del biplot): la longitud de ese vector representa la variabilidad genotípica en ese ambiente; el ángulo que forman los vectores de dos ambientes nos da la medida de cómo son de similares (cuanto mayor el ángulo, más diferentes entre ellos).

Tabla 1. Descripción de los ambientes (cada ambiente definido como una combinación de la localidad y la campaña) de los ensayos realizados en este trabajo. Se incluyen los datos climáticos tanto para toda la campaña como para los 30 días anteriores a la evaluación. (Max. T, temperatura máxima; Mín. T, temperatura mínima; Precip., precipitaciones).

Ambiente	Localidad	Campaña	Latitud	Longitud	Campaña			30 días antes de la evaluación		
					Máx. T (°C)	Mín. T (°C)	Precip. (mm)	Máx. T (°C)	Mín. T (°C)	Precip. (mm)
EGPT05	Egipto, Kafr El-Sheikh	2004/2005	31°06' N	30°56' E	34,0	2,0	121,6	34,0	5,0	0,0
EGPT06	Egipto, Kafr El-Sheikh	2005/2006	31°06' N	30°56' E	34,0	1,0	61,8	33,0	6,0	24,8
ESPN06	España, Córdoba	2005/2006	37°51' N	4°47' O	38,8	-2,0	362,0	29,1	7,5	58,8
ESPN10	España, Córdoba	2009/2010	37°51' N	4°47' O	36,4	-0,8	577,5	36,4	7,1	32,7

Para estos tres primeros ensayos de campo se calculó la “severidad estandarizada”, que consistía en expresar cada valor de severidad como el porcentaje sobre el valor más alto en ese ensayo; esto se hizo con el propósito de poder realizar una adecuada comparación visual de los resultados de los distintos ensayos del estudio múltiple.

Los análisis se han realizado con los programas estadísticos SAS (SAS, 1996) utilizando la corriente de control desarrollada por Burgueño et al. (2003) y Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EEUU).

Resultados

Ensayos de campo

Las 43 entradas que se evaluaron en los ensayos de campo en las campañas 2004/2005 y 2005/2006 presentaron un amplio rango de respuestas a roya, incluidas algunas con valores de severidad bajos (Tabla 2). Las distribuciones de frecuencias para la severidad estandarizada de estos tres ensayos sugiere la existencia de una interacción genotipo x ambiente (Figura 2). El análisis de varianza para la severidad a roya (Tabla 3) mostró efectos significativos del genotipo, el ambiente y de la interacción genotipo x ambiente.

Las dos primeras componentes principales del modelo GGA explicaron el 96% de la variación GGA, lo que supone que el biplot CP1 y CP2 (Figura 3) explica adecuadamente los datos centrados por ambiente. Las entradas que se sitúan más alejadas del origen del gráfico delimitan los vértices de un polígono (líneas discontinuas en la Figura 3). Estos genotipos son aquéllos que más contribuyen a la interacción, es decir, aquéllos que muestran la mayor o menor severidad ante la enfermedad.

Tabla 2. Valores de severidad de las entradas *V. faba* evaluadas para roya. El área sombreada delimita el subconjunto de 11 entradas seleccionadas para el ensayo de Córdoba de la campaña 2009/2010. Los valores de severidad, tomados del capítulo 1, se muestran también para los tres primeros ensayos (EE: error estándar).

Entrada	EGPT05		EGPT06		ESPN06		ESPN10	Media de roya
	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	
LPF 120	8,3	13,3	11,7	40,0	4,3	19,3	5,7	7,5
BPL 710	16,7	10,0	8,3	30,0	5,2	14,8	11,0	10,3
132-3⁽¹⁾	10,0	23,3	11,7	11,7	9,5	17,0	13,2	11,1
158-1⁽²⁾	15,7	16,7	17,4	17,5	3,3	14,3	9,3	11,4
095-3⁽³⁾	8,3	45,0	15,0	15,0	7,5	29,3	15,3	11,5
ILB 4709	8,3	8,0	21,7	20,0	8,2	40,0	10,7	12,2
152-1⁽⁴⁾	12,3	18,3	27,4	10,0	6,3	21,3	4,7	12,7
BPL 1763	26,0	15,0	20,0	13,3	7,0	9,5	3,2	14,0
135-1⁽⁵⁾	9,0	21,7	20,0	11,7	13,3	8,0	15,2	14,4
174-1⁽⁶⁾	10,0	35,7	25,3	25,0	11,7	8,8	19,3	16,6
ILB 5284	10,0	16,0	35,0	28,3	6,7	16,3	17,5	17,3
090-1⁽⁷⁾	9,00	46,7	15,0	20,0	1,8	30,0		8,6
095-1⁽⁸⁾	11,7	38,3	13,3	25,0	8,2	36,0		11,1
097-2⁽⁹⁾	5,7	31,7	20,0	15,0	8,8	68,3		11,5
BG 1261	9,0	16,7	20,0	43,3	7,3	44,3		12,1

Tabla 2. Continuación.

Entrada	EGPT05		EGPT06		ESPN06		ESPN10	Media de roya
	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	
BG 1093	8,3	11,7	20,0	25,0	8,7	59,7		12,3
BG 932	18,3	31,7	20,0	25,0	5,2	29,0		14,5
LPF 95	16,7	16,7	26,7	50,0	2,8	62,0		15,4
324	7,3	20,0	33,3	35,0	6,0	42,3		15,6
1809	7,3	32,3	28,3	25,0	14,3	35,0		16,7
132-1⁽¹⁰⁾	5,0	10,0	30,0	23,3	16,3	15,3		17,1
LPF 39	16,7	23,3	28,3	33,3	6,4	86,0		17,1
ILB 4726	11,7	21,7	26,7	13,3	16,2	17,2		18,2
BG 1122	26,7	45,0	20,0	20,0	8,7	50,7		18,4
BG 977	8,3	10,0	30,0	26,7	19,3	42,7		19,2
BPL 261	16,67	11,7	36,7	33,3	5,2	25,2		19,5
BG 924	20,0	26,7	28,3	38,3	12,1	83,7		20,1
1196	21,7	33,3	33,3	30,0	6,5	34,3		20,5
898	10,0	20,0	45,0	21,7	7,5	68,3		20,8
144	7,3	9,0	45,0	41,7	10,5	19,2		20,9
LPF 113	18,3	28,3	41,7	33,3	10,7	52,3		23,6
LPF 44	30,0	20,0	35,0	43,3	8,8	76,0		24,6
441	31,7	45,0	35,0	36,7	8,2	58,7		24,9
BPL 1179	7,3	16,7	50,0	33,3	19,5	10,3		25,6

Tabla 2. Continuación.

Entrada	EGPT05		EGPT06		ESPN06		ESPN10	Media de roya
	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	Botritis	Roya	
BG 1250	23,3	10,0	45,0	30,0	11,5	46,3		26,6
544	36,6	12,3	38,3	60,0	5,3	86,0		26,8
1646	33,3	33,3	43,3	36,7	5,7	77,3		27,4
BG 1095	46,6	15,0	33,3	25,0	13,2	57,3		31,1
179-1⁽¹¹⁾	60,0	38,3	38,3	50,0	8,6	73,7		35,6
237	56,7	15,0	35,0	21,7	16,8	26,7		36,2
1647	60,0	26,7	38,3	43,3	17,7	20,7		38,7
107-1⁽¹²⁾	75,0	40,0	43,3	43,3	9,7	90,3		42,7
LPF 05	66,7	26,7	63,3	36,7	5,0	24,7		45,0
Baraka							30,7	
Media	21,3	23,4	29,6	29,3	9,2	40,7	13,0	
EE	13,3	13,7	12,5	13,1	2,8	8,6	5,9	

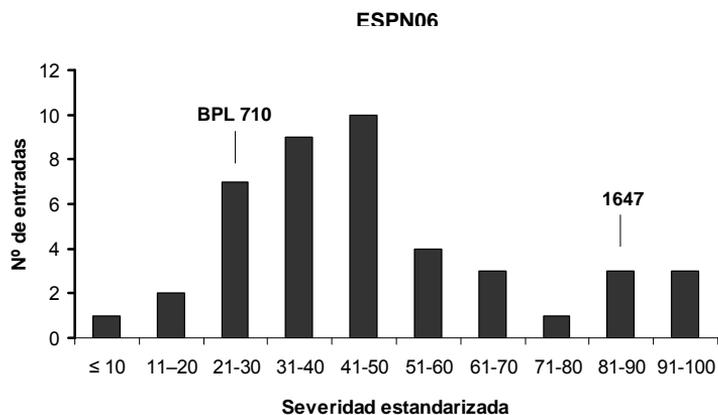
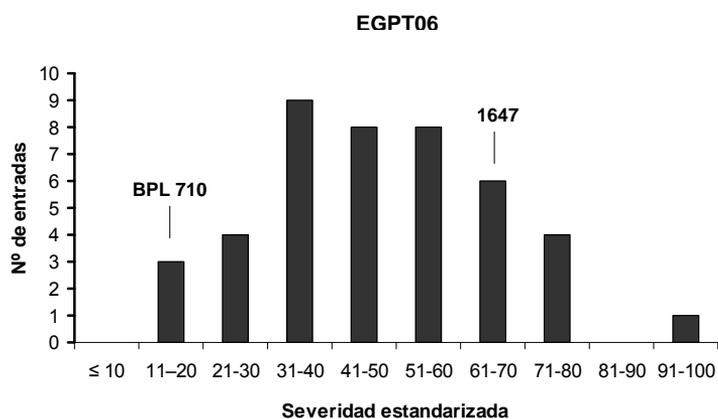
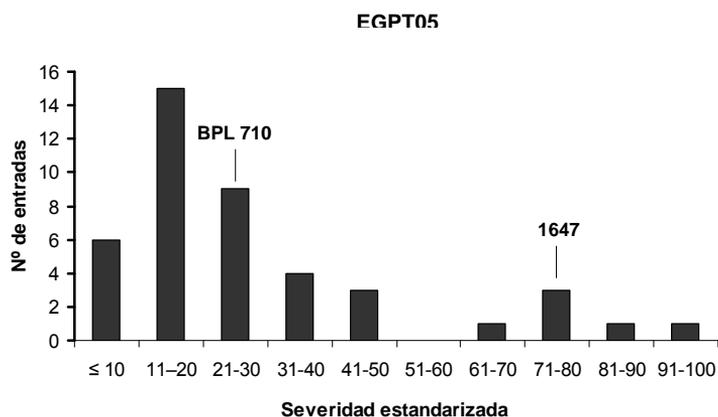
Nombres completos de aquellas entradas cuyos nombres se muestran abreviados: ⁽¹⁾ Sel.97 Lat.97 132-3; ⁽²⁾ Sel.97 Lat.97 158-1; ⁽³⁾ Sel.97 Lat.97 095-3; ⁽⁴⁾ Sel.97 Lat.97 152-1; ⁽⁵⁾ Sel.97 Lat.97 135-1; ⁽⁶⁾ Sel.97 Lat.97 174-1; ⁽⁷⁾ Sel.97 Lat.97 090-1; ⁽⁸⁾ Sel.97 Lat.97 095-1; ⁽⁹⁾ Sel.97 Lat.97 097-2; ⁽¹⁰⁾ Sel.97 Lat.97 132-1; ⁽¹¹⁾ Sel.97 Lat.97 179-1; ⁽¹²⁾ Sel.97 Lat.97 107-1.

Según se puede ver por sus respectivos vectores, los ambientes EGPT05 y EGPT06 resultaron ser muy discriminantes en comparación con ESPN06. Por otra parte, EGPT06 se diferenció mucho de EGPT05 y ESPN06, que eran más parecidos entre sí.

En la Figura 3 se ha dibujado una perpendicular al eje de abscisas CAM (línea con dos flechas) que deja a la izquierda a 17 genotipos con una severidad igual o inferior a 18% en todos los ambientes. Estos genotipos se pueden clasificar en tres grupos, según sus niveles de severidad. El grupo 1 está constituido por las entradas con valores medios de severidad iguales o inferiores al 10%. Se puede definir en él un gradiente de estabilidad, que abarca desde las entradas más estables, 095-3 y 090-1, a la menos estable, BPL 710, con las entradas LPF 120, 095-1, 132-3 y 158-1 mostrando una interacción moderada. El grupo 2 incluye las entradas con severidades del 10 al 15%. Entre ellas, las entradas 135-1, 174-1, BG 1261 y 152-1 presentan un nivel alto de estabilidad; las entradas 097-2 e ILB 4709 muestran una baja interacción, mientras que la de BG 932 es moderada y de signo opuesto. Finalmente, en el grupo 3 se encuentran las entradas con valores de severidad del 16 al 18%: ILB 5284 es más bien estable, con una interacción moderada; las entradas 132-1 y BPL 1763 presentan interacciones opuestas y mayores.

De estas entradas resistentes a roya seleccionamos aquellas 11 que mostraban las resistencias más altas a botritis (Tabla 2). La resistencia a roya de estas entradas se confirmó en el ensayo de campo de Córdoba de la campaña 2009/2010 (Tabla 2). Finalmente, el análisis de varianza para la severidad de estas 11 entradas en los cuatro ensayos de campo en los que se evaluaron no mostró diferencias significativas ni para los factores entrada ni ambiente, ni para su interacción (datos no mostrados).

Figura 2. Distribución de las 43 entradas de *V. faba* evaluadas en 3 ambientes (definidos en la Tabla 1) por rangos de severidad estandarizada. Los diferentes patrones sugieren una interacción genotipo x ambiente. Se indica la posición de las entradas BPL 710 y 1647 para facilitar las comparaciones, ya que estas entradas presentaron medias de severidad muy diferentes.



Ensayos en planta completa en condiciones controladas

Evaluación de la resistencia a los aislados de España y de Egipto

El análisis factorial de la varianza para la severidad de enfermedad, siendo genotipo y aislado los factores fijos, detectó diferencias significativas para genotipo, pero no para aislado ni para su interacción (Tabla 4). Así, como se puede ver en la Figura 4, no hubo diferencias en la respuesta individual de cada entrada a los dos aislados.

Tabla 3. Análisis de varianza de los efectos de ambiente y genotipo en las severidad de las 43 entradas de *V. faba* evaluadas frente a roya en 3 ambientes (GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: fracción de la suma de cuadrados asociada a cada término o interacción).

Fuente	GL	SC	CM	F
Ambiente (A)	2	26462,31	13231,15**	19
Repetición	6	3720,96	620,16	
Genotipo (G)	42	31825,62	757,75***	23
G x A	84	30853,31	367,30***	23
Error	252	43253,53	171,64	
Total	386	136115,73		

*** y ** indican efectos significativos a 0,0001 y 0,001 niveles de probabilidad, respectivamente

Evaluación de la interacción roya-botritis

Se llevó a cabo un análisis factorial de varianza, siendo en este caso los factores fijos genotipo e inoculación previa con *B. fabae*. Nuevamente, hubo diferencias significativas sólo para genotipo, pero no para inoculación con *B. fabae* ni para su interacción (Tabla 5). La Figura 5 muestra que el comportamiento de cada entrada es independiente de que haya sido previamente inoculada con *B. fabae* o no.

Figura 3. (A) Biplot GGA de la primera y segunda componente principal (CP1 y CP2 respectivamente) basado en la severidad a roya de 43 genotipos de *Vicia faba* en 3 ambientes. Los ambientes se muestran en azul, subrayados y en cursiva, con los vectores como líneas azules continuas. El porcentaje de la variación GGA explicado por cada componente principal se encuentra en la esquina inferior izquierda (19% y 77%). Los genotipos que más contribuyen a la interacción delimitan los vértices de un polígono (líneas discontinuas en naranja) que encierra al resto de las entradas. CAM es el eje de la “Coordenada ambiental media”, que une el origen con la media ambiental. Se ha trazado una perpendicular a este eje, que deja a la izquierda aquellos genotipos con una severidad inferior a 18%. Estos genotipos se han clasificado en tres grupos (rodeados con un círculo y numerados).

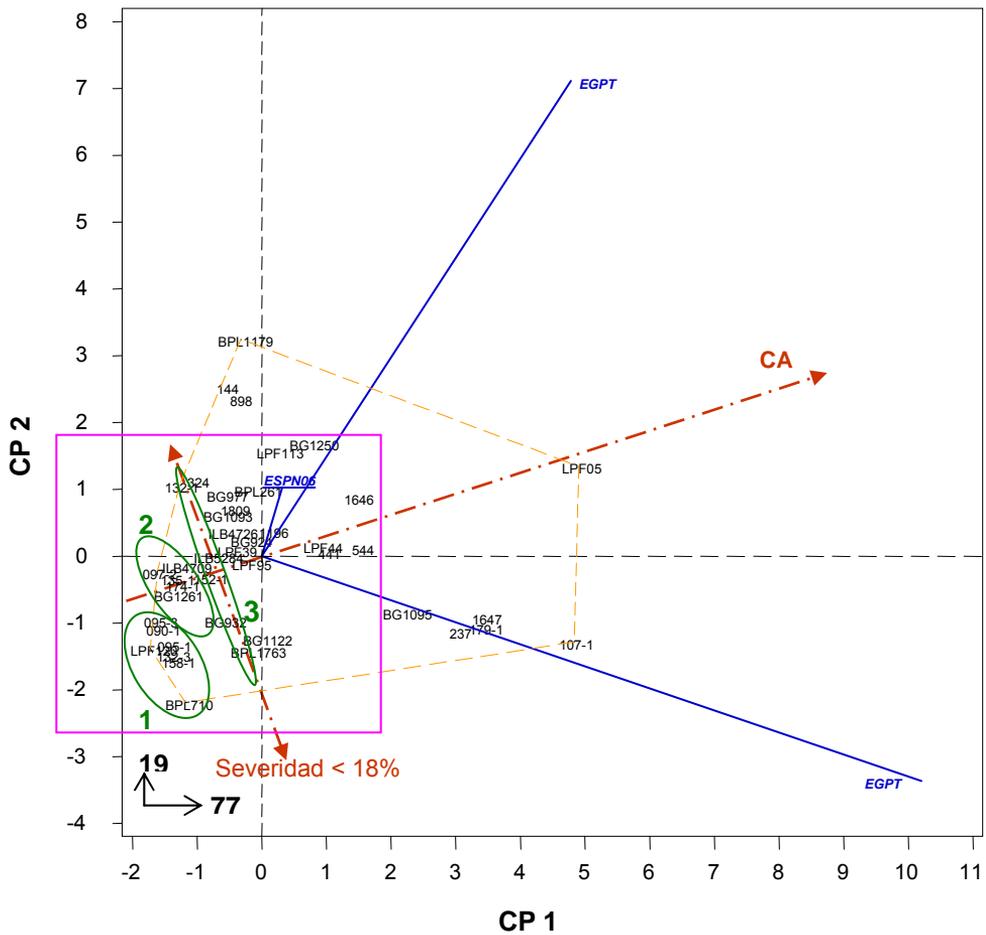


Figura 3. (B) Ampliación de la zona delimitada por el cuadro de líneas rosas en (A) La leyenda es la misma que en (A).

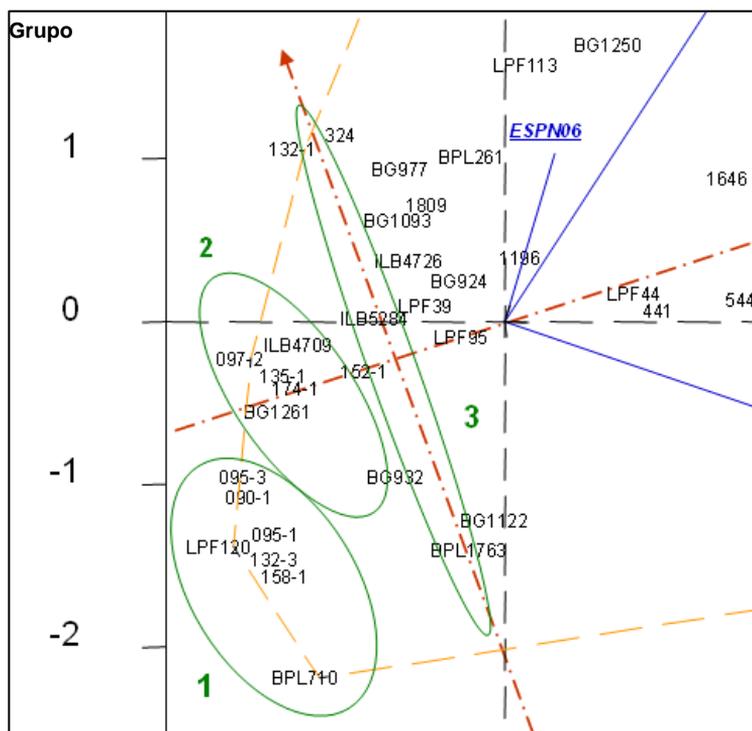
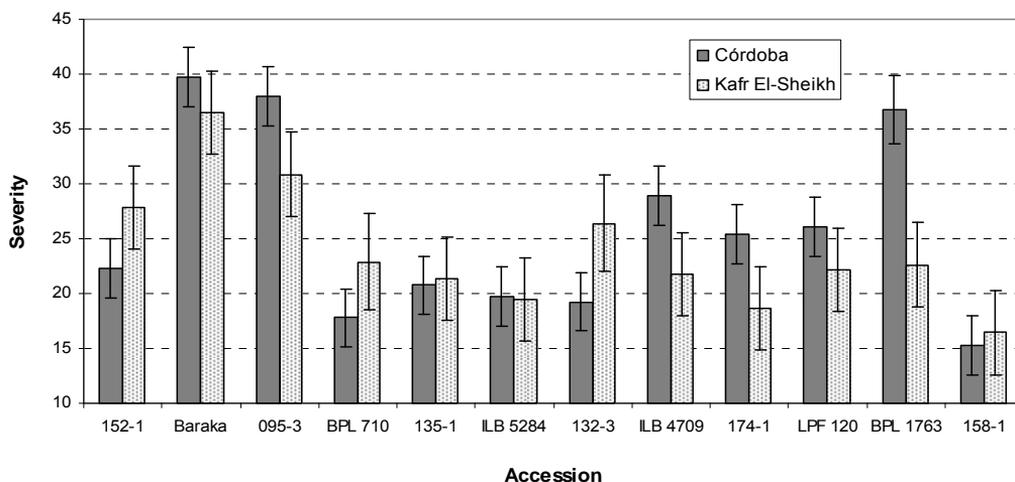


Tabla 4. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y de aislado de roya (uno de Córdoba y el otro de Kafr El-Sheikh) en la severidad de 12 entradas de *V. faba* (GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios).

Fuente	GL	SC	CM
Genotipo	11	3374,36	306,76***
Aislado	1	73,87	73,87
Genotipo * Aislado	11	845,38	76,85
Error	69	2975,55	43,12
Total	92	7269,16	

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

Figura 4. Valores de severidad para las 12 entradas de *V. faba* evaluadas frente a dos aislados de roya (uno de Córdoba y el otro de Kafr El-Sheikh). No se observan diferencias apreciables en las respuestas individuales de cada entrada a los dos aislados. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.



Discusión

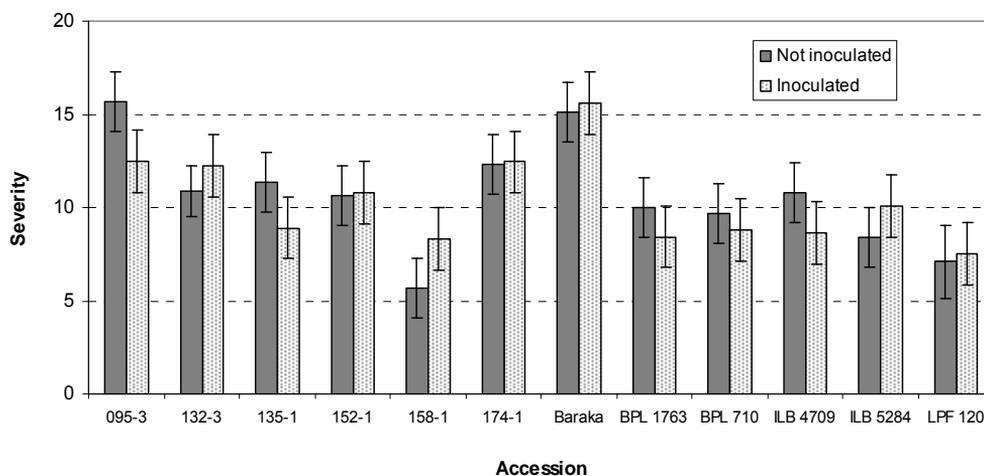
Con este trabajo completamos el proceso de identificación de genotipos de *V. faba* de interés potencial por su resistencia a roya y a botritis. En el marco de una evaluación en múltiples ambientes para resistencia a botritis, la respuesta a roya se evaluó en tres ensayos de campo en los que esta enfermedad se encontraba presente. Esto permitió afinar la selección para dos zonas concretas en lugares tan distantes como España y Egipto, de modo que se pudo restringir el número de entradas que hay que seguir considerando para la mejora. Ya que es conveniente tener datos de al menos dos campañas para cada localidad, llevamos a cabo un ensayo de campo adicional en España, pero ya con la ventaja de evaluar sólo las entradas más prometedoras. El resultado de todo este proceso ha sido la identificación de una colección de entradas en las que se combina la resistencia tanto a roya como a botritis, sin haber tenido que establecer un ensayo en múltiples ambientes independiente para cada enfermedad.

Tabla 5. Análisis de varianza de los efectos de genotipo y de inoculación previa con *B. fabae* en la severidad de 12 entradas de *V. faba* (GL: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; CM: cuadrados medios; F: fracción de la suma de cuadrados asociada a cada término o interacción).

Fuente	GL	SC	CM	F
Genotipo	11	403,20	36,65***	54,36
Botritis	1	1,49	1,48	0,20
Genotipo * Botritis	11	52,62	4,78	7,10
Error	48	284,42	5,92	
Total	71	741,73		

*** indica efectos significativos a 0,0001 niveles de probabilidad

Figura 5. Valores de severidad para las 12 entradas de *V. faba* evaluadas frente a roya previamente inoculadas o no con botritis. No se observan diferencias apreciables entre las plantas de cada entrada inoculadas con *B. fabae* y las que no lo fueron. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.



El análisis GGA permitió la identificación de un grupo de entradas que presentaban baja severidad y buena estabilidad en su respuesta a roya. Esta estabilidad es destacable puesto que los tres ambientes evaluados resultaron ser muy diferentes entre ellos. La severidad media fue más baja en ESPN06 que en los dos ambientes de Egipto: esto apunta a una menor virulencia del aislado de Córdoba, lo que confirma estudios previos que indicaban mayor virulencia de los aislados de Egipto (Emeran et al., 2001). Por otra parte, los ambientes EGPT05 y EGPT06 fueron muy diferentes, como muestra el ángulo entre sus vectores. Podemos suponer que las más altas precipitaciones durante los 30 días previos a la evaluación en EGPT06 serían responsables de la mayor severidad en ese ambiente, ya que la humedad es un factor clave para el desarrollo de la enfermedad (Sillero et al., 2000). Esto pone de manifiesto la importancia de las condiciones climáticas en la respuesta de los cultivos a las enfermedades.

Tras comparar los resultados del biplot GGA con los que presentó la misma colección frente a botritis, se realizó una selección de 11 entradas con buen comportamiento para ambas enfermedades; de las 3 entradas previamente descritas como resistentes a las dos enfermedades, BPL 261, BPL 1179 y BPL 710 (Sillero et al., 2010), sólo se seleccionó esta última, ya que las otras dos no presentaron una buena respuesta ni en términos de severidad ni de estabilidad. BPL 710 mostró una respuesta más bien inestable, como también le sucedió a otra de las líneas seleccionadas, BPL 1763, pero ambas se escogieron porque se han mostrado en varias ocasiones como buenas fuentes de resistencia a botritis (Sillero et al., 2010), y en nuestros ensayos han tenido bajos niveles de severidad por roya. El hecho de que el análisis de los resultados de estas 11 entradas para los cuatro ensayos de campo (dos en Egipto y dos en España) no detectase diferencias significativas ni para la entrada, el ambiente, o la interacción entrada x ambiente, confirma que este grupo constituye una colección prometedora, tanto por sus severidades bajas como por su respuesta estable en los distintos ambientes estudiados.

Los experimentos en condiciones controladas permiten estudiar el material vegetal manteniendo las condiciones ambientales bajo control (Sillero et al., 2006). En el primero de nuestros ensayos, se evaluaron las reacciones específicas de 11 entradas seleccionadas frente a las dos razas del patógeno presentes en Córdoba y en Kafr El-Sheikh, respectivamente. Los resultados muestran que no existen diferencias genotípicas en la respuesta a estos aislados, lo que confirma la estabilidad de la resistencia encontrada en estas entradas en los ensayos de campo.

Con el segundo experimento en condiciones controladas pretendíamos averiguar si la infección previa con *B. fabae* podría alterar de algún modo la respuesta de estas entradas a *U. viciae-fabae*, ya que, en la temporada agrícola, la roya normalmente aparece después de la botritis. Se sabe que la existencia de una enfermedad previa puede afectar al desarrollo de una segunda, ya sea induciendo resistencia o reduciendo el vigor de la planta (Herath et al., 2001; Metraux et al., 2002). Sin embargo, no ha sido así en nuestro caso, y los resultados permiten establecer que la resistencia encontrada a roya es independiente de la existencia de una infección previa de botritis. Se sabe que *Botrytis cinerea* es un caso raro de un patógeno necrotrofo que no induce resistencia sistémica adquirida en *Arabidopsis thaliana* (Govrin y Levine, 2002); se puede formular la hipótesis de que lo mismo sucede en el caso de *B. fabae* y *V. faba*. En cualquier caso, estos resultados corroboran el valor de estas entradas como fuentes de resistencia múltiple a estas enfermedades.

Es de destacar que estos genotipos presenten resistencia simultánea a unos patógenos tan diferentes como son *U. viciae-fabae* y *B. fabae*, siendo el uno biotrofo y el otro necrotrofo. Surge la cuestión de si los genes responsables de estas resistencias estarán relacionados de algún modo, o son simplemente parte de diferentes sistemas de defensa que han evolucionado en los mismos genotipos. Para dar una respuesta adecuada se deberían llevar a cabo correlaciones genéticas de estas resistencias. Existen casos de interacciones

negativas entre resistencias a patógenos biotrofos y necrotrofos (Glazebrook, 2005), aunque también se han descrito ejemplos de correlaciones positivas en genotipos que presentan resistencia a ambos tipos de patógenos (Poland et al., 2009). Si se hallasen correlaciones, habría que dilucidar si se deben a desequilibrios de ligamiento, pleiotropía o ligamiento estrecho entre los genes de resistencia (Mitchellolds et al., 1995).

En conclusión, este trabajo muestra que la evaluación múltiple para diferentes enfermedades es una práctica ventajosa que permite ahorrar tiempo y recursos en el proceso de mejora. Hemos identificado 11 entradas con resistencia estable tanto a roya como a botritis, las cuales constituyen un material prometedor para desarrollar variedades comerciales con esta resistencia múltiple. El trabajo futuro debería centrarse en la incorporación de dichas resistencias a germoplasma de interés, así como en establecer la relación, si existiese, entre los genes responsables de la resistencia a estas dos enfermedades.

Bibliografía

- Burgueño, J., Crossa, J., Vargas, M., 2003. SAS programs for graphing GE and GGE biplots. Biometrics and Statistics Unit, CIMMYT, Int. Mexico.
- Emeran, A.A., Sillero, J.C., Rubiales, D., 2001. Physiological specialisation of *Uromyces viciae-fabae*. En: European Association for Grain Legume Research-AEP (Eds.), Towards the Sustainable Production of Healthy Food, Feed and Novel Products. Proceedings of the 4th European Conference on Grain Legumes, Cracow. p. 263.
- Fininsa, C., Tefera, T., 2006. Multiple disease resistance in common bean genotypes and their agronomic performance in eastern Ethiopia. International Journal of Pest Management 52, 291-296.
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual review of phytopathology 43, 205-227.
- Govrin, E.M., Levine, A., 2002. Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). Plant Molecular Biology 48, 267-276.
- Gurung, S., Bonman, J.M., Ali, S., Patel, J., Myrfield, M., Mergoum, M., Singh, P.K., Adhikari, T.B., 2009. New and diverse sources of multiple disease resistance in wheat. Crop Science 49, 1655-1666.
- Herath, I., Stoddard, F.L., Marshall, D.R., 2001. Evaluating faba beans for rust resistance using detached leaves. Euphytica 117, 47-57.
- Hussain, S., Ali, A., Zahid, M.A., Iqbal, S.M., 2008. Multiple disease resistance in lentil germplasm from Pakistan. Pakistan Journal of Botany 40, 897-903.
- Metraux, J.P., Nawrath, C., Genoud, T., 2002. Systemic acquired resistance. Euphytica 124, 237-243.
- Mitchell-Olds, T., James, R.V., Palmer, M.J., Williams, P.H., 1995. Genetics of *Brassica rapa* (syn. *campestris*). 2. Multiple disease resistance to three

- fungual pathogens: *Peronospora parasitica*, *Albugo candida* and *Leptosphaeria maculans*. *Heredity* 75, 362-369.
- Nene, Y.L., 1988. Multiple-disease resistance in grain legumes. Annual review of phytopathology, 203-217.
- Pande, S., Kishore, G.K., Upadhyaya, H.D., Rao, J.N., 2006. Identification of sources of multiple disease resistance in mini-core collection of chickpea. *Plant Disease* 90, 1214-1218.
- Parlevliet, J.E., 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124, 147-156.
- Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C., Nelson, R.J., 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 21-29.
- Sillero, J.C., Fondevilla, S., Davidson, J., Patto, M.C.V., Warkentin, T.D., Thomas, J., Rubiales, D., 2006. Screening techniques and sources of resistance to rusts and mildews in grain legumes. *Euphytica* 147, 255-272.
- Sillero, J.C., Moreno, M.T., Rubiales, D., 2000. Characterization of new sources of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba*. *Plant Pathology* 49, 389-395.
- Sillero, J.C., Villegas-Fernandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fernandez-Aparicio, M., Rubiales, D., 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research* 115, 297-307.
- Yan, W., 2002. Singular-value partitioning in biplot analysis of multi-environment trial data. *Agronomy Journal* 94, 990-996.
- Yan, W.K., Hunt, L.A., Sheng, Q.L., Szlavnic, Z., 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Science* 40, 597-605.

Discusión general

Decíamos en la introducción de este trabajo que nuestro reto era ofrecer desde la mejora vegetal soluciones sostenibles que permitiesen reducir la merma de la producción de los cultivos de habas ocasionada por botritis, con la intención de aportar una pequeña contribución a la mejora de la seguridad alimentaria en el mundo. Es ahora el momento de valorar cómo hemos respondido a este reto.

Nuestro proyecto se estructuró en torno a seis objetivos. La lógica que seguimos en el planteamiento de los mismos fue la de partir de lo más básico y general en mejora para profundizar posteriormente en aspectos más específicos y concretos de la respuesta de resistencia a la enfermedad. Así, comenzamos por la selección de fuentes de resistencia en campo, sin las cuales la mejora frente a enfermedades sería imposible. Sin embargo, además del objetivo inmediato de aportar material de utilidad para la obtención de variedades resistentes, considerábamos también necesario aumentar nuestro conocimiento sobre cómo funciona la resistencia a varios niveles, abarcando desde lo macroscópico hasta lo molecular. Por eso han resultado de interés los experimentos en condiciones controladas, que permiten estudiar aisladamente la influencia de diferentes factores en la interacción planta / patógeno, las observaciones microscópicas que ayudan a definir en qué consiste la resistencia, y los estudios de biología molecular, pues identificar los genes que intervienen en la resistencia es llegar a desvelar una de las claves fundamentales de la misma. A la luz de los resultados y las conclusiones extraídas de los mismos, podemos considerar que los objetivos se han cumplido.

Gracias a trabajos de este tipo se pueden ofrecer desde soluciones bastante concretas (como poner a disposición de la comunidad científica nuevas fuentes de resistencia con vistas a su incorporación en variedades cultivadas), hasta nuevo conocimiento teórico de limitada aplicación práctica inmediata.

Este es, de hecho, uno de los dilemas que hay que afrontar a la hora de abordar un proyecto como este. ¿Se apuesta por conseguir cuanto antes resultados prácticos que puedan llegar en el menor tiempo posible a los campos de cultivo, o se decide incrementar el conocimiento teórico sobre la cuestión aun cuando suponga un retraso en la propuesta de soluciones? Es, en cierto modo, el clásico debate entre investigación aplicada y básica. Nosotros no creemos que este dilema tenga una respuesta definitiva. Las circunstancias y los recursos disponibles son los que condicionarán en gran medida la estrategia a adoptar. En ocasiones la urgencia del problema exigirá la búsqueda inmediata de soluciones, y en otras, tanto por disponibilidad de tiempo como de recursos, será factible permitirse un estudio más profundo y sosegado del mismo. En cualquier caso, creemos que, a la larga, la acumulación de conocimiento que permita comprender en toda su profundidad un fenómeno como el que ha sido objeto de nuestro estudio resulta altamente beneficiosa.

Así, en nuestro caso concreto, somos conscientes de que falta mucho tiempo antes de que la identificación de QTLs asociados con la resistencia a botritis en habas pueda llegar a concretarse en medidas prácticas. Lo mismo puede decirse del estudio de expresión de los factores de transcripción en el sistema *M. truncatula* / *Botrytis* spp. Pero entendemos que es una información única y valiosa de por sí, y que establece las bases para seguir avanzando en unas líneas que podrán dar resultados de gran interés a medio o largo plazo.

Por todo esto no hemos planteado nuestro trabajo como algo cerrado, sino proyectado hacia el futuro. De hecho, hemos seguido desarrollando alguna de las líneas ya comenzadas. Así, disponemos en la actualidad de varios cruzamientos para incorporar las fuentes de mayor resistencia a genotipos de interés, estando alguno de ellos en estado de selección bastante avanzado; hemos desarrollado dos líneas puras recombinantes entre genotipos identificados como parcialmente resistentes y susceptibles; y estamos

trabajando en la caracterización de los genotipos con resistencia múltiple a botritis y a roya.

También entendemos que hemos hecho aportaciones metodológicas de relevancia. Encontramos de mucha utilidad el haber determinado que los ensayos en planta completa son los más adecuados hasta la fecha para los experimentos en condiciones controladas: si se emplean en lugar de los ensayos en hoja cortada se incrementará la calidad y la fiabilidad de la nueva información que la investigación vaya aportando. Igualmente es de destacar la puesta a punto del protocolo para observaciones microscópicas del proceso de infección, con una técnica tan poderosa como es la microscopía confocal. Finalmente, el establecimiento de *Medicago truncatula* como planta modelo para la interacción *V. faba* / *Botrytis* spp. es de gran importancia, ya que pone a disposición de la lucha contra la botritis todos los recursos que se encuentran desarrollados para *M. truncatula*. Creemos que con estos avances aportamos herramientas eficaces para que los investigadores de esta enfermedad de las habas puedan llevar a cabo futuras investigaciones que permitan conocerla mejor y contribuir a su control.

Consideramos, pues, que con nuestro trabajo hemos contribuido a la resolución del problema de la infección de *V. faba* por parte de *B. fabae*. Es una contribución modesta e inconclusa, pero nos parece que, más allá de nuestros resultados y conclusiones, hemos puesto de manifiesto que desde la mejora vegetal existe todavía un amplio campo de trabajo para hacer nuevas aportaciones al control de esta enfermedad. Muchas de esas aportaciones podrán enlazar con los resultados de este trabajo, continuándolos, ampliándolos e incluso aplicándolos a estrategias que ahora mismo no somos capaces de prever. Somos, pues, de la opinión de que el valor de nuestras investigaciones no está tanto en tal o cual resultado particular que hayamos obtenido con ellas, sino en las opciones de futuro a las que dan lugar. Como se suele decir, la

actividad investigadora lleva a abrir nuevas puertas: es el momento de pasar por ellas y seguir avanzando.

Conclusiones

1. Se han identificado fuentes de resistencia a botritis con un gran potencial para su uso en programas de mejora. Todas ellas presentan una resistencia incompleta que, al menos en algunos casos, tiene probablemente una base poligénica, lo que debería facilitar la obtención de una resistencia durable en el material definitivo. El siguiente paso, pues, sería la combinación de las diferentes fuentes de resistencia en el mismo fondo genético, con vistas a la obtención de variedades con alto grado de resistencia.
2. El ensayo en planta completa en condiciones controladas es una herramienta bastante eficaz para evaluar la respuesta de las plantas de *V. faba* a *B. fabae*, siendo más adecuado que el ensayo en hoja cortada. Resulta también de utilidad para estudiar la influencia de diferentes factores en el desarrollo de la enfermedad.
3. La mayor susceptibilidad a botritis de las hojas más viejas en comparación con las más jóvenes no es un fenómeno generalizado, sino que parece ser dependiente del genotipo. Sin embargo, ni la edad de la planta ni la temperatura influyen en principio en la respuesta global de las habas a botritis, aunque la temperatura afecta de manera diferencial a las reacciones de las plantas jóvenes y adultas, habiéndose detectado una resistencia en planta joven a alta temperatura.
4. Se ha puesto a punto un protocolo para la observación a nivel microscópico de la interacción *B. fabae* / *V. faba* en todas las etapas del proceso de infección, tanto en pre- como en post-penetración. Este protocolo resultará de utilidad para futuros estudios, como puede ser la caracterización de la respuesta de diferentes genotipos a botritis. En el caso del genotipo BPL 710, su resistencia parece estar relacionada con una falta de adhesión del patógeno a la superficie vegetal.

5. Se ha construido un mapa genético de un cruzamiento en F₂ útil para el estudio de dos enfermedades importantes de habas, botritis y roya. Será necesario avanzar en la saturación del mapa, incrementando el número y la variedad de marcadores situados en el mismo.
6. Se ha identificado un QTL responsable en principio de un 40% de la resistencia a *B. fabae* en el genotipo parcialmente resistente BPL 261. Los siguientes pasos que llevar a cabo consistirán en: la identificación los loci responsables de la variación todavía no asignada; la validación los QTLs detectados en diferentes ambientes y fondos genéticos; y el empleo de la selección asistida por marcadores para introducir esta resistencia en variedades de interés comercial. La disponibilidad de una RIL de este cruzamiento facilitará el desarrollo de estos trabajos.
7. Se ha establecido un sistema para el estudio de las interacciones entre *Medicago truncatula* y *Botrytis* spp. que puede servir como modelo para el sistema patogénico *Vicia faba* / *Botrytis* spp. Esto permitirá poner a disposición del estudio de la botritis los abundantes recursos y herramientas desarrollados para *M. truncatula*.
8. El análisis de los factores de transcripción de *M. truncatula* en su interacción con *Botrytis* spp. ha permitido identificar, por un lado, aquellos involucrados en las respuestas diferenciales a *B. fabae* y a *B. cinerea* y, por otro lado, aquellos que participan en la resistencia a estos patógenos. Queda por asignar un papel más definido a cada uno de estos FTs, describiendo e integrando las rutas metabólicas en las que pueden tomar parte, y complementando estos resultados con los de estudios patológicos y moleculares adicionales.
9. Se ha comprobado que la evaluación múltiple para diferentes enfermedades es una práctica ventajosa que permite ahorrar tiempo y

recursos en el proceso de mejora. Mediante ella se han identificado entradas con resistencia estable tanto a roya como a botritis, las cuales constituyen un material prometedor para desarrollar variedades de interés con esta resistencia múltiple. El trabajo futuro debería centrarse en la incorporación de dichas resistencias a germoplasma de interés, así como en establecer la relación, si existe, entre los genes responsables de la resistencia a estas dos enfermedades.

Conclusions

1. Sources of resistance with great potential for breeding have been identified. All of them present an incomplete resistance that, at least in some cases, has quite probably a multi-gene basis, which should facilitate obtaining a durable resistance in the final material. The next step would involve the combination of the different sources of resistance into the same genetic background, aiming to obtain varieties with a high level of resistance.
2. The whole-plant test under controlled conditions is quite an efficient tool for assessing the response of *V. faba* plants to *B. fabae*, being more appropriate than the detached-leaf test. It is also useful for studying the influence of different factors on the development of the disease.
3. The greater susceptibility to chocolate spot of older leaves in comparison to younger ones is not a general phenomenon but seems to be genotype dependent. The response of faba bean to chocolate spot does not appear to be influenced either by plant age or temperature, although temperature affects differentially the reactions of young and adult plants, having detected a partial high-temperature young-plant resistance.
4. A protocol has been developed for the microscopic observation of the interaction *B. fabae* / *V. faba* through all the stages of the infection process, both in pre- and post-penetration. This protocol will be of interest for future studies, such as characterising the differential genotypic responses to chocolate spot. The resistance of genotype BPL 710 seems to be related to a lack of adhesion of the pathogen to the plant surface.

5. A genetic map of an F₂ cross useful for the study of two important diseases of faba bean, chocolate spot and rust, has been constructed. It will be needed to increase the saturation of the map, by adding more and more diverse markers to it.
6. A QTL responsible in principle of a 40% of the resistance to *B. fabae* of genotype BPL 261 has been identified. Further work will include: identifying the loci responsible for the variation still unassigned; validating the detected QTLs on different genetic backgrounds and environments; and employing marker assisted selection to introduce this resistance into accessions of commercial interest. An existing RIL of this cross will facilitate these works.
7. A system has been established to study the interactions between *Medicago truncatula* and *Botrytis* spp. It may be a useful model for the *Vicia faba* / *Botrytis* spp. pathosystem. This will allow to use in the study of chocolate spot the abundant resources and tools developed for *M. truncatula*.
8. The profiling of transcription factors has permitted to identify, on the one hand, those involved on the differential responses to *B. fabae* and *B. cinerea* and, on the other hand, those participating in the resistance to these pathogens. It is now necessary to assign a clearer role to these TFs, describing and integrating the pathways in which they may take part, and complementing these results with those of additional molecular and pathological studies.
9. Multiple evaluation for different diseases when screening germplasm for resistance has proven to be an advantageous practise that saves time and resources in the process of breeding. We have identified accessions with stable resistance to both rust and chocolate spot that

constitute a promising material for developing commercial varieties with multiple-disease resistance. Future work should focus on incorporating these resistances into germplasm of interest, as well as on establishing the relationship, if any, between the genes responsible for resistance to these diseases.