



**Universidad de León**

**Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias  
Escuela Superior y Técnica de  
Ingeniería Agraria**

**CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA DE  
JUDÍA Y LOCALIZACIÓN DE CARACTERES  
CUANTITATIVOS EN EL MAPA GENÉTICO  
DE LA ESPECIE**

**Tesis Doctoral**

---

**Elena Pérez Vega**

**León, 2008**





Universidad de León

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El Dr. D. Juan José Ferreira Fernández y el Dr. D. Ramón Giraldez Ceballos-Escalera como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización de germoplasma de judía y localización de caracteres cuantitativos en el mapa genético de la especie” realizada por D<sup>a</sup>. Elena Pérez Vega en el Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 10 de Diciembre de 2007.

Fdo.: Dr. D. Juan José Ferreira Fernández

Fdo.: Dr. D. Ramón Giraldez Ceballos-Escalera





Universidad de León

## **ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO**

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias en su reunión celebrada el día 14 de Diciembre de 2007 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de germoplasma de judía y localización de caracteres cuantitativos en el mapa genético de la especie", dirigida por el Dr. D. Juan José Ferreira Fernández y el Dr. D. Ramón Giraldez Ceballos-Escalera, elaborada por D<sup>a</sup>. Elena Pérez Vega y cuyo título en inglés es el siguiente "Bean germplasm characterization and mapping of quantitative trait loci in a genetic map".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 14 de Diciembre de 2007.

El Secretario,

Fdo.: José Benito Valenciano Montenegro

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Pedro Antonio Casquero Luelmo



*Y aunque ya sabéis que estas cosas no se me dan demasiado bien, no quiero dejar pasar esta oportunidad para daros a todos las GRACIAS:*

*Juan José Ferreira y Ramón Giraldez, directores de esta tesis, porque me disteis vuestro tiempo y paciencia, enseñándome y ayudándome para llegar hasta aquí.*

*Mi tutor Bonifacio Reinoso Sánchez, por su amabilidad y por sus correcciones.*

*El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias, SERIDA (Villaviciosa) y a la gente que me encontré allí: Ana, me enseñaste a dar los primeros pasos en un laboratorio, siempre me echaste una mano (o dos) cuando me hizo falta. A Jorge, fue una suerte trabajar contigo. A Aída, la última incorporación del grupo. Montse, porque su trabajo y disposición hicieron más fácil el mío. A Pobladura, Zapico y al resto de la cuadrilla.*

*En la Caja Rural de Gijón, José Antonio Migoya siempre se preocupó de mí y de mi trabajo.*

*A los de casa: mis padres y mi hermana, porque me apoyáis en todos los proyectos que emprendo. A Pedro, porque pusiste calma en los momentos de locura (¡los dos sabemos que fueron muchos!), porque sin ti nada de esto tendría sentido.*



Este trabajo de investigación ha sido desarrollado en el Servicio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), en colaboración con la Universidad de Oviedo y gracias a la subvención de los proyectos: RF03-024-C6-03, RTA2005-00115-CO2-01, AGL2004-08145-CO2-02/AGR y RF2007-0014-CO4-01.

En el transcurso de su programa de doctorado, Elena Pérez Vega ha sido beneficiaria de una beca de la Caja Rural de Gijón y de una beca INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria).



# Índice

<b>1._ Introducción general</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ....	3
1.2 Descripción morfológica .....	4
1.3 Utilización y producción.....	6
1.4 Caracterizaciones.....	8
1.5 Trabajos previos .....	10
1.5.1 Caracterización, conservación y utilización de recursos fitogenéticos.....	11
1.5.2 Análisis genéticos .....	11
1.5.3 Mejora genética desarrollada en faba Granja.....	12
1.6 Objetivos generales.....	12
<b>2._ Caracterización y utilización de la colección nuclear de judías del CRF-INIA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Introducción .....	17
2.1.1 Los recursos fitogenéticos.....	17
2.1.2 Colecciones nucleares .....	18
2.1.3 La colección nuclear de judías del CRF-INIA .....	19
2.1.4 Objetivos.....	19
2.2 Material y métodos .....	21
2.2.1 Material vegetal .....	21
Colección nuclear del CRF-INIA.....	21
Variedades de referencia.....	22
2.2.2 Caracterización morfológica.....	23
2.2.3 Caracterización asistida por marcadores moleculares .....	25
Obtención de ADN genómico .....	25
Obtención de marcadores moleculares.....	25
Visualización de los productos de amplificación .....	26
2.2.4 Agrupamiento del material .....	27
2.2.5 Índices de diversidad.....	27
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Resultados de la caracterización morfológica .....	29
2.3.2 Índices de diversidad.....	33
2.3.3 Resultados de la caracterización molecular .....	34
Análisis de marcadores moleculares en la CN-CRF .....	34
Análisis de las relaciones filogenéticas .....	36
2.4 Discusión .....	43

<b>3._ Evaluación agronómica y de calidad de nuevas líneas de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) desarrolladas en el SERIDA .....</b>	<b>49</b>
3.1. Introducción .....	51
3.1.1 Tipo comercial faba Granja Asturiana .....	51
3.1.2 Programas de mejora genética: objetivos y variedades desarrolladas .....	52
Antracnosis .....	52
Virus del mosaico común y necrótico de la judía .....	53
Arquitectura o hábito de crecimiento de la planta .....	55
Programas de mejora genética desarrollados.....	55
3.1.3 Objetivos.....	58
3.2 Material y métodos .....	59
3.2.1 Material vegetal .....	59
3.2.2 Ensayos de campo .....	59
3.2.3 Caracteres analizados.....	62
Caracteres morfológicos.....	62
Caracteres fenológicos .....	64
Caracteres de interés agronómico .....	64
Caracteres vinculados a la calidad.....	65
3.2.4 Análisis estadístico .....	68
3.3 Resultados.....	69
3.3.1 Caracteres morfológicos .....	69
3.3.2 Caracteres relacionados con la fenología.....	73
3.3.3 Caracteres de interés agronómico .....	73
3.3.4 Caracteres vinculados a la calidad.....	76
3.4 Discusión .....	80
<b>4._ Incorporación de caracteres cuantitativos morfo-agronómicos y de calidad de semilla al mapa genético de judía.....</b>	<b>85</b>
4.1 Introducción.....	87
4.1.1 Mapas genéticos en judía .....	87
4.1.2 Mapa genético 'Xana'/Cornell 49242 .....	88
4.1.3 Objetivos.....	89
4.2. Material y Métodos .....	90
4.2.1 Material vegetal .....	90
4.2.3 Ensayos de campo .....	93
4.2.4 Caracteres analizados.....	94
Caracteres morfo-agronómicos .....	94

Caracteres vinculados a la calidad.....	95
Caracteres fenológicos .....	96
4.2.5 Localización de los QTLs en el mapa genético .....	97
4.3 Resultados.....	98
4.3.1 Variación fenotípica en las RILs.....	98
4.3.2 Identificación de los QTLs .....	102
4.3.3 Contribución de los parentales en cada uno de los QTLs analizados.....	104
4.3.4 Localización de los QTLs en el mapa genético .....	106
4.4. Discusión .....	110
<b>5._ Conclusiones generales .....</b>	<b>115</b>
<b>6._ Referencias .....</b>	<b>119</b>



# Abreviaturas y acrónimos

ACP:	Análisis de Componentes Principales
ADN:	Ácido dexosirribonucleico
AFLP:	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism)
BCMNV:	Virus del mosaico necrótico común de la judía (Bean common mosaic necrotic virus)
BCMV:	Virus del mosaico común de la judía (Bean common mosaic virus)
BOE:	Boletín Oficial del Estado
CA4:	Capacidad de absorción de agua a las 4 horas
CA16:	Capacidad de absorción de agua a las 16 horas
CAP:	Polimorfismo por digestión del producto de amplificación (Cleavage amplified polymorphism)
CIAT:	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIM:	Intervalo de mapeo compuesto (Composite interval mapping)
cm:	Centímetros
cM:	Centimorgan
CN-CRF:	Colección nuclear del Centro de Recursos Fitogenéticos
Co -:	Gen que confiere resistencia a antracnosis
COMAV:	Centro de la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana
CRF-INIA:	Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
CSIC:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
ESTIA:	Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)
FF:	Final de floración
g:	Gramos
GL:	Grupo de ligamiento
IBPGR:	Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (Internacional Board for Plant Genetic Resources)
IF:	Inicio de floración
IGP:	Indicación Geográfica Protegida
IM:	Intervalo de mapeo (Interval mapping)
INIA:	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

ISSR:	Secuencias internas simples repetidas (Inter-simple sequence repeat)
LL:	Longitud del foliolo central de la hoja
LOD:	Logaritmo de la razón de probabilidades (Fiabilidad de la fracción de recombinación) (Logarithm of odd)
LW:	Ancho del foliolo central de la hoja
m:	Metros
m <sup>2</sup> :	Metros cuadrados
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
N:	Número de medidas
ns:	No significativo
O.M.:	Orden Ministerial
°C:	Grados centígrados
p:	Probabilidad
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PH:	Grueso de la vaina
PIC:	Índice de contenido polimórfico (polymorphism index content)
PL:	Longitud de la vaina
PP:	Proporción de piel
PW:	Ancho de la vaina
QTL:	Loci implicados en caracteres cuantitativos (Quantitative trait loci)
R:	Recolección
R <sup>2</sup> :	Porcentaje de variación
RAPD:	ADN polimórfico amplificado al azar (Random amplified polymorphism DNA)
RFLP:	Polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction fragments length polymorphism)
RIL:	Línea consanguínea recombinante (Recombinant inbred line)
SCAR:	Región amplificada de una secuencia caracterizada (Sequence characterized amplified region)
SERIDA:	Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
SH:	Grueso de la semilla

SL:	Longitud de la semilla
SP:	Número de semillas/vaina
Sp -:	Proteína
SSD:	Descendiente único (Single seed descendent)
SSR:	Repetición de secuencia simple (Simple sequence repeat)
STS:	Secuencias simples repetidas (Sequence tagged sites)
SW:	Peso de la semilla
Swi:	Ancho de la semilla
UPGMA:	Unweighted pair-group method with arithmetic average
UPOV:	Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants)
V:	Verdeo
W:	Wattios



## **1.\_ Introducción general**

---



## 1.1 *Phaseolus vulgaris* L.

La familia de las leguminosas (o *Fabaceae*) incluye más de 18.000 especies silvestres y cultivadas que se extienden por climas tropicales y templados. La subfamilia de las *Papilionoideae*, constituida por 476 géneros, se estima que apareció en el continente americano hace 50 millones de años. En ella, la tribu *Phaseolae* reúne las leguminosas más importantes desde el punto de vista económico, incluyendo las especies *Vigna unguiculata* L. (“frijol caupí”), *Glycine max* L. (soja) y *Phaseolus vulgaris* L. o judía común (Freytag y Debouck, 2002; Broughton *et al.*, 2003).

Dentro del género *Phaseolus* ssp. se cultivan 5 especies (Debouck, 1999; Freytag y Debouck, 2002): *P. polyanthus* (conocida como “year long”, ‘bolti’ o ‘piloya’), *P. acutifolius* (“terapy bean”, ‘térapy’, ‘escomite’), *P. lunatus* (“Lima bean”, “judía de Lima”, ‘comba’), *P. coccineus* (“scarlet runner”, ‘ayocote’, ‘judión’) y *P. vulgaris* (‘faba’, judía común, alubia, ‘frijol’) siendo esta última la que mayor distribución ha alcanzado a nivel mundial. La distancia genética entre algunas de estas especies es grande, impidiendo en la mayoría de los casos realizar cruzamientos interespecíficos de gran interés para transferir caracteres deseables de una especie a otra (Debouck, 1999).

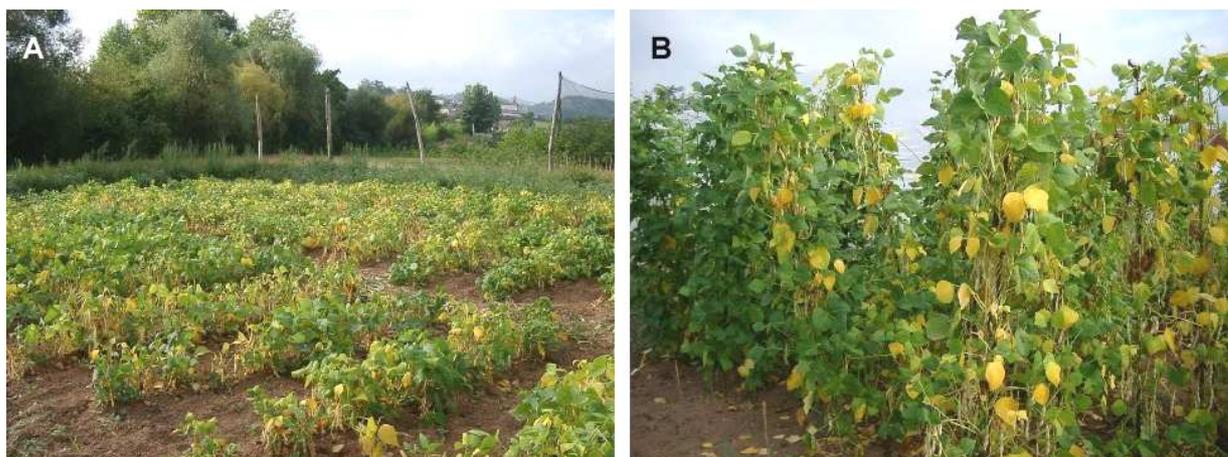
Tanto en materiales silvestres como en cultivados, en judía común se han descrito dos grupos de germoplasma o acervos genéticos principales en base a diferencias en una proteína de semilla, la faseolina (Gepts, 1990), en marcadores moleculares (Koenig y Gepts, 1989; Tohme *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 2000; Duran *et al.*, 2005) y caracteres morfológicos (Gepts y Debouck, 1991; Singh *et al.*, 1991). El acervo mesoamericano, mayoritariamente con faseolina tipo S en sus formas cultivadas, se extiende desde Méjico a través de Centro América hasta el norte de Colombia. El acervo andino, mayoritariamente con faseolina tipo T o C en sus formas cultivadas, abarca Perú, Chile, Bolivia y norte de Argentina. La distancia existente entre los dos acervos genéticos se refleja en los problemas encontrados por algunos autores para realizar cruzamientos entre materiales andinos y mesoamericanos (Shii *et al.*, 1980; Gepst y Bliss, 1985; Koinange y Gepts, 1992; Singh y Molina, 1996). Algunos autores han llegado a sugerir, considerando principalmente caracteres morfológicos y procedencias geográficas, la existencia de subgrupos que denominan ‘razas’ dentro del material local cultivado en América Latina. En este sentido, dentro del grupo mesoamericano se han señalado las razas Mesoamérica, Durango y Jalisco y dentro del andino las razas Nueva Granda, Perú y Chile (Singh *et al.*, 1991). La existencia de estos subgrupos de germoplasma dentro de los dos principales acervos genéticos se ha puesto de manifiesto también con marcadores moleculares (Díaz y Blair, 2006).

Desde Latinoamérica y a través de las relaciones que se establecieron entre el continente europeo y americano, la judía comenzó a dispersarse por todo el mundo llegando a estar presente actualmente en los cinco continentes (Anuario Estadístico de la FAO [www.fao.org/statistics/](http://www.fao.org/statistics/)). La información proporcionada principalmente por la faseolina, ha sugerido diferentes rutas de dispersión. Por ejemplo, la mayor parte de los cultivares locales encontrados en Europa presentan características propias de los materiales andinos, como faseolina tipo T o C y un tamaño grande de semilla (Gepts y Bliss, 1988) por lo que posiblemente hayan sido introducidos desde esa área geográfica. En cambio, los materiales cultivados en el Caribe, en Chile o en Brasil, poseen preferentemente, unas características propias del germoplasma mesoamericano, como son faseolina tipo S y tamaño pequeño de semilla (Gepts, 1988; Paredes y Gepts, 1995) sugiriendo una introducción desde este origen.

## 1.2 Descripción morfológica

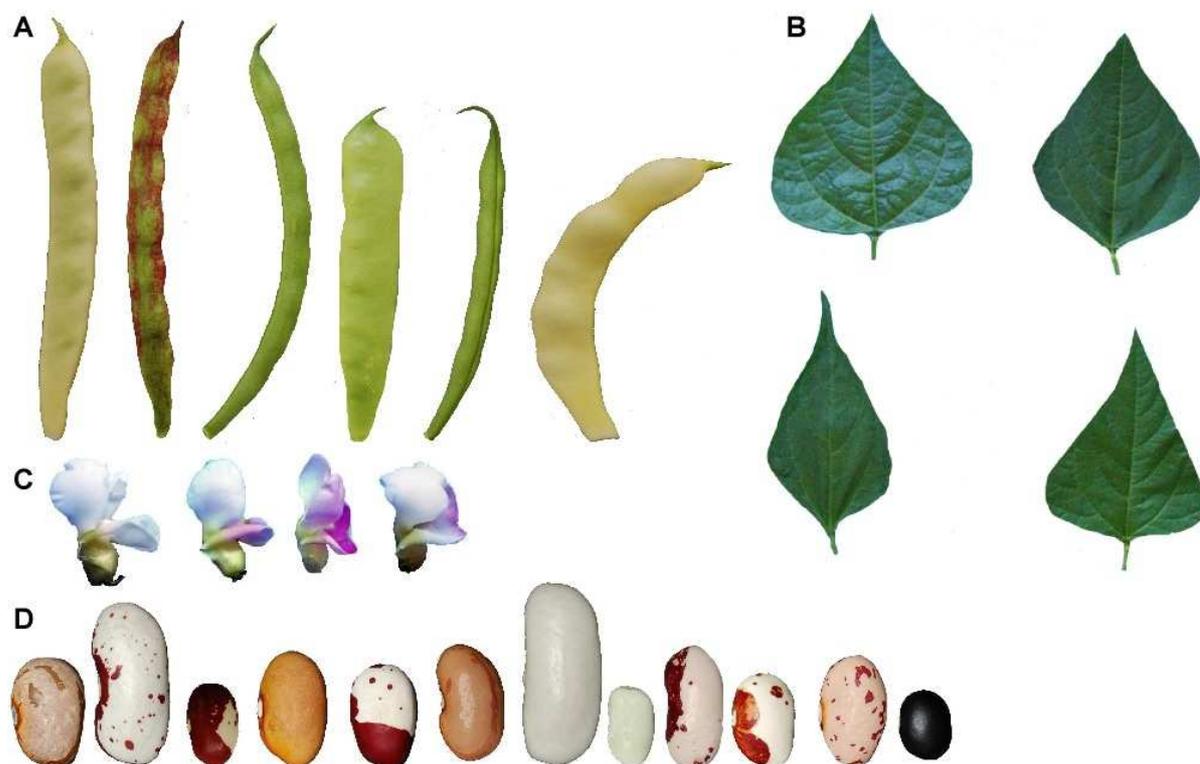
La especie *Phaseolus vulgaris* L., en su forma cultivada, es una planta anual herbácea. El tallo es delgado y está formado por nudos y entrenudos de número y longitud variable. En el primer nudo se sitúan los cotiledones, en el segundo surgen las hojas primarias simples y en el tercero nacen las hojas características de la judía, formadas por tres folíolos agudos con estípulas en la base. El hábito de crecimiento, o porte de la planta, se ha clasificado en cuatro tipos principales atendiendo a caracteres como la terminación del tallo, número y longitud de los entrenudos y aptitud para trepar (Singh, 1982; Debouck e Hidalgo, 1985) que pueden simplificarse en dos grandes grupos (véase figura 1.1):

- *Hábito de crecimiento determinado*: el tallo principal terminan en inflorescencia o racimo de flores (tipo I).
- *Hábito de crecimiento indeterminado*: el tallo no termina en inflorescencia. A su vez dentro de esta categorías se han descrito tres variantes principales: indeterminado erecto (tipo II), indeterminado rastroso (tipo III) e indeterminado trepador (tipo IV).



**Figura 1.1.** Hábitos de crecimiento en judía común. **A.** Plantas en maduración con hábito de crecimiento determinado (tipo I). **B.** Plantas en maduración con hábito de crecimiento indeterminado trepador (tipo IV).

Las flores son papilionáceas y están organizadas en racimos axilares o terminales. Cada flor está compuesta por una quilla espiral formada por dos pétalos fusionados, dos pétalos laterales denominados alas y un quinto pétalo, llamado estandarte, orientado hacia el exterior. La quilla envuelve el gineceo y el androceo favoreciendo el contacto de las anteras y el estigma. Poseen diez estambres y un único ovario que contiene varios óvulos (Freytag y Debouck, 2002). La fecundación es generalmente de tipo autógama. En las condiciones de cultivo en Asturias la tasa de alogamia se ha estimado en menos del 0,74% (Ferreira *et al.*, 2000). Tras la fecundación, el ovario crece formando una vaina que contiene un número variable de semillas. Como se observa en la figura 1.2, la morfología de las hojas, flores, vainas y semillas es muy diversa ya que existe una gran variabilidad en cuanto a tamaño, forma, color y patrones de distribución de color (Voyses, 2000; Ferreira *et al.*, 2005; Pérez-Vega *et al.*, 2006b). En general, es una especie extraordinariamente polimórfica desde el punto de vista morfológico.



**Figura 1.2.** Ejemplos de la variación para algunos caracteres morfológicos en judía. **A.** Diversidad para forma, tamaño y color de la vaina. **B.** Diversidad para la forma de las hojas. **C.** Diversidad para el color de las alas y el estandarte de la flor. **D.** Diversidad para forma, tamaño, color y patrón de distribución de color de la semilla.

## 1.3 Utilización y producción

La gran variabilidad morfológica de la especie hace que su aprovechamiento para el consumo humano sea también diverso. Dependiendo de la variedad/genotipo, se pueden aprovechar las semillas o las vainas. Las semillas secas se pueden consumir cocidas después de hidratarse (judía seca o judía grano) o tostadas ('nuñas'). En ocasiones las semillas también se pueden consumir antes de su madurez, es decir, antes de finalizar su deshidratación en la vaina ('pochas'). En el aprovechamiento como vaina inmadura (judía verde o fréjoles), las vainas se cosechan antes de que comiencen a desarrollarse las semillas. Algunos ejemplos de los distintos tipos de aprovechamiento pueden observarse en la figura 1.3.



**Figura 1.3.** Diferentes aprovechamientos de la judía común. **A, B y C.** Fenotipos de vaina con aprovechamiento para verdeo: amarillas, verdes y jaspeadas. **D.** Semillas 'pochas' de faba Granja. **E.** Semillas secas de faba Granja.

En lo que se refiere a la producción, la judía común es una de las leguminosas más importantes. La producción mundial de judía seca superó las  $23 \times 10^6$  t/año, según datos de la FAO para el año 2004 (Anuario Estadístico de la FAO [www.fao.org/statistics/](http://www.fao.org/statistics/)). Aunque no se encuentra entre las 10 especies más consumidas en la alimentación humana, su semilla constituye una fuente muy importante de proteínas en la dieta, sobre todo en América Latina y África (Broughton *et al.*, 2003), donde complementa a otros alimentos como el maíz, como fuente de carbohidratos. Además, aporta vitaminas como la biotina y micronutrientes como el hierro, fósforo, magnesio y manganeso y en menor medida zinc, cobre y calcio (Broughton *et al.*, 2003).

En España, la producción de judía grano en 2005 superó las 16.000 t y la de judía verde alcanzó las 215.000 t (Anuario de estadísticas Agroalimentarias; [www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechoscifras/cifras.htm](http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechoscifras/cifras.htm)) lo que la convierte en el mayor productor de esta legumbre dentro de la Unión Europea. En términos generales, la producción para vaina (judía de verdeo) se localiza en el área mediterránea mientras que en el noroeste se localiza el cultivo para semilla seca, judía grano (Marco físico de la agricultura;

[www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechoscifras/cifras.htm](http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechoscifras/cifras.htm)). Existen notables diferencias entre ambos aprovechamientos de la especie que afectan al manejo del cultivo, mecanización, nivel de modernización/tecnificación, etc. De hecho, el cultivo para vaina verde, se considera cultivo hortícola. Todos estos factores han favorecido que las empresas de semillas fundamentalmente trabajen y comercialicen variedades para producción de vaina, disponiendo de sus propios programas de mejora genética. En cambio, las empresas de semilla no trabajan sobre variedades cuyo aprovechamiento es la semilla seca debido, entre otras causas, al menor rendimiento económico frente a la judía de verdeo, a la facilidad con que se conserva la identidad varietal (es una especie autógama) y a la ausencia de un hábito de adquisición de semilla de siembra por parte de los agricultores.

Probablemente el hecho de que no se hayan desarrollado variedades comerciales de judía grano, como ocurre en otras especies hortícolas, ha favorecido que en la Península Ibérica se continúen cultivando variedades locales entre las que se pueden destacar: los tipos Riñón y Canela de León, cultivadas tradicionalmente en los regadíos leoneses (Asensio *et al.*, 1990; Reinoso *et al.* 2007), el tipo Ganxet en Cataluña, los tipos Pinta alavesa y Tolosana en el País Vasco, el tipo faba Granja o el tipo Verdina en Asturias (Ferreira *et al.*, 2005). Son numerosas las variedades locales descritas en España (véase por ejemplo, Puerta Romero, 1961) por lo que el cultivo de la judía, se considera un cultivo tradicional en nuestro país representando, para muchas regiones un importante recurso socioeconómico.

Algunas de estas variedades de alto prestigio y asociadas a la gastronomía regional cuentan además, con una marca de calidad reconocida como: la producción ecológica, principalmente en el caso de la judía de verdeo o las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) para la semilla grano. Son los casos de: la “Alubia de La Bañeza-León” (Orden APA/289/2006, BOE Nº 35 10/2/2006), la “Judía de el Barco de Ávila” (Orden 5/1/1989) y la “Faba Granja Asturiana” (Orden 6-7/1990, BOE Nº 170 17/7/1990). A pesar de que estas variedades se están haciendo un hueco importante en el mercado al considerarse productos de alta calidad, actualmente en España la mayor parte de la legumbre seca que se consume procede de la importación.

## 1.4 Caracterizaciones

Para aprovechar la diversidad dentro de las especies cultivadas es necesario conocer previamente sus características y poder decidir así, que materiales se ajustan mejor a unas necesidades específicas. Una caracterización se puede definir como una descripción de los materiales en función de un juego de caracteres o descriptores, a ser posible estandarizados para facilitar el intercambio de la información. Los enfoques y caracteres que se pueden usar en

la descripción de los materiales pueden ser de muy distinta naturaleza: morfológicos, bioquímicos, fenológicos, agronómicos o moleculares.

En general, una descripción de los materiales comienza por una caracterización morfológica basada en caracteres cualitativos y/o cuantitativos. Éstos, son características fenotípicas variables dentro de la especie como forma, color, tamaño y otras propiedades de diferentes partes de la planta, fruto o semilla. Es deseable que estos caracteres sean sencillos y rápidos de tomar, estables, con pocas clases y bien definidas (que no se solapen), de interés para la utilización de la especie, repetibles y objetivos. Los mayores inconvenientes que presentan estas caracterizaciones basadas en descriptores morfológicos son: el número limitado de caracteres, las diferencias entre clases fenotípicas que en ocasiones no son claras, la herencia compleja de muchos de estos caracteres, la influencia ambiental en algunos casos, la necesidad de invertir importantes recursos en este trabajo y la necesaria experiencia del personal implicado.

En los últimos años las caracterizaciones morfológicas tienden a ser complementadas con la utilización de marcadores moleculares. Un marcador molecular se puede definir como cualquier diferencia a nivel molecular que está controlada genéticamente y puede ser utilizada en el análisis genético. Los marcadores moleculares presentan una serie de ventajas respecto a los marcadores morfológicos: pueden ser altamente polimórficos (multialélicos) por lo que detectan mayor variabilidad; no están afectados por el ambiente; son objetivos, puesto que el resultado del análisis no depende tanto de la apreciación de la persona que realiza la caracterización; pueden obtenerse en estadios tempranos del desarrollo de la planta; en principio son neutros a la selección natural y generalmente presentan una herencia sencilla (Nuez, 2000). Los marcadores moleculares pueden clasificarse en marcadores bioquímicos (isoenzimas y proteínas de semilla) y en marcadores de ADN, aunque frecuentemente el término "marcador molecular" se aplica sólo a variantes en el ADN. En otras palabras, los marcadores de ADN exploran la variación a nivel de la molécula donde reside la información genética, el ADN. No obstante, en judía común uno de los marcadores moleculares más utilizados es una proteína de semilla, la faseolina, cuya variación ha sido asociada con los dos principales acervos genéticos descritos dentro de la especie: grupo andino y grupo mesoamericano (Gepts *et al.*, 1986; Gepts y Bliss, 1988).

Respecto a los marcadores de ADN, se han desarrollado diferentes técnicas que permiten revelar la variación a nivel de la molécula de ADN. Algunos autores agrupan los diferentes tipos de marcadores atendiendo a la metodología seguida para su obtención (García-Mas *et al.*, 2000):

- *Marcadores no basados en la amplificación por PCR* (“polymerase chain reaction” o reacción en cadena de la polimerasa), entre los que se incluyen marcadores RFLPs (polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción), minisatélites, etc. Para visualizar este tipo de marcadores generalmente se utilizan técnicas de hibridación con sondas marcadas.

- *Marcadores obtenidos mediante amplificación por PCR*, como los marcadores RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), microsátélites (secuencias simples repetidas), AFLPs (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados), SCARs (región amplificada de una secuencia caracterizada), ISSR (secuencias internas simples repetidas), CAPs (polimorfismo por digestión del producto de amplificación) y STS (sitios etiquetados por la secuencia). Para la visualización de este tipo de marcadores se utilizan diferentes metodologías, ya sea para poner de manifiesto el ADN mediante tinciones (tinción con nitrato de plata o con bromuro de etidio) o mediante marcaje (con fluorescencia o radiactividad).

La utilización de un tipo u otro de marcador dependerá de la disponibilidad del laboratorio, de la especie y de los objetivos perseguidos. Cada marcador presenta ventajas y desventajas, relacionadas con su tipo de herencia, el nivel de polimorfismo que proporciona, la repetibilidad, la facilidad en la obtención e identificación, el coste económico, el conocimiento de su posición en el mapa genético, etc. En todo caso, la información derivada de las caracterizaciones asistidas por marcadores moleculares ha sido aplicada en plantas en la conservación y gestión de los recursos fitogenéticos, en el conocimiento del sistema reproductivo, en la selección asistida, en la identificación varietal, en la elaboración de mapas genéticos, en el análisis de la herencia de caracteres complejos, en estudios de diversidad genética, etc.

A pesar del interés que tiene una caracterización morfológica o molecular, al final resulta imprescindible conocer el comportamiento del material vegetal en campo, es decir, su adaptación a diferentes manejos de cultivo, sus producciones, su fenología, su comportamiento frente a estrés biótico y abiótico y su rendimiento (caracterización agronómica). La información que proporciona este tipo de caracterización es imprescindible, por ejemplo, antes de promover la distribución de determinados materiales.

## **1.5 Trabajos previos**

En las dos últimas décadas, el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) junto con el Área de Genética de la Universidad de Oviedo han desarrollado diferentes líneas de investigación con el fin último de promover el cultivo sostenible de esta especie. Fundamentalmente, se ha trabajado en los siguientes aspectos:

## 1.5.1 Caracterización, conservación y utilización de recursos fitogenéticos

En el año 1991, se estableció la colección de judías del SERIDA con el objeto de contribuir a la conservación y utilización de la diversidad genética de la especie *Phaseolus* spp. de la Cornisa Cantábrica. Esta colección fue creada a partir de una colección de trabajo reunida por M. A. Fueyo, fruto de prospecciones realizadas en Asturias, centrada en los fenotipos de semilla tipo faba Granja y Granjina (Fabada y Canellini, respectivamente, según Voystest, 2000). Desde entonces, han sido constantes las incorporaciones de nuevos materiales, a partir de otras colecciones o de prospecciones realizadas por investigadores del SERIDA (Ferreira *et al.*, 2005).

Las entradas conservadas en la colección SERIDA están agrupadas en dos grandes grupos en función de su origen: germoplasma local y stock genético. El germoplasma local incluye 381 entradas recolectadas en el norte de España. El stock genético incluye 387 líneas o variedades obtenidas de otras instituciones como fuentes de genes y caracteres o derivadas de los programas de mejora genética desarrollados en el SERIDA (Ferreira *et al.*, 2005). El material local ha sido sometido a diferentes caracterizaciones y evaluaciones (Campa, 2006; Campa *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007) y se ha definido un juego de 72 entradas representativas de la diversidad conservada en esta colección y por tanto, prioritarias en su conservación.

En 2003 se incorpora al stock genético, la colección nuclear del CRF-INIA (Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) propuesta por De la Rosa *et al.* (2000). Esta colección está constituida por 211 entradas recolectadas en España y hasta la fecha no había sido caracterizada y evaluada en su totalidad. La disponibilidad de una colección nuclear bien caracterizada desde diferentes enfoques constituye una herramienta de gran utilidad para posteriores trabajos en la especie.

## 1.5.2 Análisis genéticos

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios encaminados a ampliar la información acerca de la herencia de caracteres de interés como la resistencia a antracnosis (Méndez de Vigo *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2008), se han identificado marcadores moleculares estrechamente ligados a genes de resistencia o el hábito de crecimiento (Mukeshimana *et al.*, 2005; Pañeda *et al.*, 2007) y se han desarrollado dos mapas genéticos con el objeto de disponer de una herramienta para la localización de genes de interés. Uno de estos mapas fue elaborado sobre la descendencia F<sub>2</sub> derivada del cruzamiento Andecha x A252 (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2007b). Otro mapa genético se ha elaborado en la población de líneas recombinantes consanguíneas derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242 (Pañeda, 2005; Rodríguez-Suárez, 2005; Campa, 2006; Sánchez, 2006). Este mapa incluye un total de 302 marcadores

organizados en 11 grupos de ligamiento por lo que resulta un soporte excelente para la localización de loci vinculados a caracteres cuantitativos (QTLs) de interés agronómico, fenológicos y relacionados con la calidad comercial de las semillas.

### 1.5.3 Mejora genética desarrollada en faba Granja

En los últimos años se han desarrollado programas de mejora genética con objeto de incorporar caracteres que mejoren la rentabilidad del cultivo de faba Granja en Asturias, los caracteres sometidos a mejora fueron:

- *Resistencia genética a antracnosis*. Enfermedad fúngica producida por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. y Cav. que afecta de forma grave al cultivo de judía en el norte de España. El tipo faba Granja resulta susceptible frente a las razas locales de este patógeno.
- *Resistencia genética al virus del mosaico común (BCMV) y el virus necrótico del mosaico común (BCMNV)*. El tipo faba Granja resulta susceptible a ambos patógenos.
- *Arquitectura o hábito de crecimiento de la planta*. Las poblaciones cultivadas de faba Granja tienen un hábito de crecimiento indeterminado trepador lo que repercute negativamente en el manejo y rendimiento del cultivo

Fruto de este trabajo de mejora se dispone de una serie de líneas esencialmente derivadas de la variedad comercial 'Andecha' (tipo faba Granja) con fenotipo de semilla faba Granja aunque portadoras de nuevas combinaciones de genes. Al inicio de este trabajo no se disponía de datos acerca del comportamiento de estas variedades élite en campo desde una perspectiva agronómica y de calidad, aspectos de gran importancia antes de iniciar el proceso de liberación las nuevas variedades.

## 1.6 Objetivos generales

A partir de la situación descrita en el punto anterior, el objetivo general de esta Tesis pretende aportar una nueva contribución a:

- a) Ampliar el conocimiento de la diversidad genética local mediante el estudio de la colección nuclear del Centro de Recursos Fitogenéticos (Madrid).
- b) Conocer en profundidad los materiales desarrollados en el SERIDA vía mejora genética para promover la liberación de aquellas líneas con mejores resultados.

c) Obtener información acerca del control genético de caracteres comúnmente utilizados en las caracterizaciones y en el desarrollo de programas de mejora.

Para facilitar el seguimiento del trabajo, éste se ha organizado en tres apartados estrechamente relacionados. A su vez, cada apartado se ha estructurado en: introducción, material y métodos, resultados y discusión. Los apartados se han titulado:

- Caracterización y utilización de la colección nuclear de judías del CRF-INIA.
- Evaluación agronómica y de calidad de nuevas líneas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) desarrolladas en el SERIDA.
- Incorporación de caracteres cuantitativos morfo-agronómicos y de calidad de semilla en el mapa genético de judía.



## **2.\_ Caracterización y utilización de la colección nuclear de judías del CRF-INIA**

---



## 2.1 Introducción

### 2.1.1 Los recursos fitogenéticos

El hombre siempre ha utilizado los diferentes recursos disponibles en su entorno, entre ellos se incluyen las especies vegetales. De este modo, ha domesticado y adaptado un gran número de dichas especies con diferentes fines dando lugar a numerosas variedades locales que constituyen una diversidad genética particular conocida como recursos fitogenéticos (Cubero *et al.*, 2006).

El Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura los define como "cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la alimentación y la agricultura" ([www.fao.org/AG/cgrfa/Spanish/itpgr.htm](http://www.fao.org/AG/cgrfa/Spanish/itpgr.htm)). Bajo esta definición, se incluyen normalmente las siguientes categorías de materiales: variedades locales o variedades comerciales de especies cultivadas; especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas-Alcázar, 1983). Los recursos fitogenéticos son la base para la recuperación de variedades locales, el desarrollo de nuevas variedades y para llevar a cabo estudios genéticos básicos de ahí que sean considerados una pieza clave en la seguridad alimentaria y el en desarrollo sostenible (véase por ejemplo Planes de actuación 2004-2007 en conservación y utilización de recursos fitogenéticos; BOE N° 180 del 27/07/04).

En España, la conservación de los recursos fitogenéticos se articula a través de una red de colecciones de germoplasma (colecciones de campo y colecciones de semilla) que en el caso concreto de la judía está formada por diversas colecciones de trabajo y bancos de semilla. Dentro de las primeras destacan la de la ESTIA de la Universidad de León, la del NEIKER-País Vasco y la del Consorci Escola Industrial de Barcelona. Los bancos de semillas que constituyen colecciones activas, se localizan en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA) (Ferreira *et al.*, 2005), en la Misión Biológica de Galicia (CSIC) en Pontevedra, en el Banco de Germoplasma de Hortícolas de Zaragoza y en el Centro de la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Además, en esta red se incluye el Centro de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CRF-INIA), Madrid, donde según la legislación vigente (Orden del 23/04/1993; Orden ECI/2510/2004) reside la colección base de semillas y en la que debe estar depositado un duplicado de todas las colecciones de semilla incluidas en la red.

## 2.1.2 Colecciones nucleares

El mantenimiento de una colección de germoplasma implica una serie de actividades como son: la adquisición del material, la conservación, la multiplicación y regeneración, la caracterización y evaluación y la documentación (Kameswara *et al.*, 2006). Estos procesos pueden llegar a ser muy costosos en tiempo y en recursos materiales y humanos, dependiendo de la especie y del número de accesiones que se reúnen. Muchas colecciones llegan a disponer de numerosas entradas, algunas de ellas incorporadas de un modo poco organizado, lo que conduce a que exista presencia de: entradas duplicadas (accesiones idénticas derivadas del intercambio entre colecciones), repetidas (accesiones idénticas procedentes de diferentes prospecciones), o muy similares (próximas desde un punto de vista genético y/o morfológico). Por todo esto, se tiende a depurar las colecciones o a establecer colecciones nucleares que faciliten el mantenimiento y utilización de la diversidad genética. La depuración de una colección busca minimizar aquellas entradas repetidas o duplicadas, cuya contribución a la diversidad total reunida sea escasa. En definitiva, lo que se pretende es disponer de colecciones de menor tamaño para facilitar su mantenimiento, caracterización y utilización.

El concepto de colección nuclear fue introducido por Frankel (1984). Para una colección de germoplasma dada, una colección nuclear se define como un limitado juego de entradas que representan la diversidad genética reunida en dicha colección (Brown, 1995; van Hintum *et al.*, 2000). De este modo, las colecciones nucleares se crean para proporcionar una muestra representativa y estructurada de la colección, que además presenta un tamaño mucho más manejable que la colección completa.

En judía común se han descrito algunas colecciones nucleares que se han utilizado con fines muy diferentes. Así, por ejemplo, a partir de la colección del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colombia) donde se reúne la mayor colección mundial de esta especie, se han propuesto colecciones nucleares tanto para las entradas cultivadas como para las entradas silvestres (Tohme *et al.*, 1996). Estas colecciones nucleares se establecieron considerando la caracterización morfológica y los datos de pasaporte con el fin de representar la mayor parte de las áreas agroecológicas del continente americano. También, han sido sometidas a diferentes niveles de evaluación y caracterización confirmándose en todos los casos la existencia de dos grandes grupos de germoplasma: grupo andino y grupo mesoamericano. En Europa, donde la especie fue introducida, se han propuesto algunas colecciones nucleares como la descrita por Rodiño *et al.*, (2003) para la Península Ibérica a partir de la colección conservada en la Misión Biológica de Galicia o la colección nuclear del CRF-INIA propuesta por De la Rosa *et al.* (2000); en adelante CN-CRF.

### 2.1.3 La colección nuclear de judías del CRF-INIA

El Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF-INIA, Alcalá de Henares, Madrid) es el responsable del mantenimiento del inventario nacional y de la conservación de la colección base de semillas ortodoxas de la red española de recursos fitogenéticos (O.M. de 23 de Abril de 1993; BOE del 7/05/1993). En la colección base se conservan las entradas a largo plazo y los intercambios son reducidos. Además, este centro mantiene colecciones activas de algunos grupos de cultivos, siendo las leguminosas grano uno de los más importantes (De la Rosa *et al.*, 2005). Las entradas han llegado al CRF procedentes de expediciones de recolección o a través de donaciones e intercambios con otras colecciones incluidas en la red. En la actualidad, esta colección incluye 2842 entradas de la especie *Phaseolus vulgaris* L., de las que 2472 se han recolectado en España y se conservan en la colección activa ([www.inia.es/webcrf/CRFesp/Paginaprincipal.asp](http://www.inia.es/webcrf/CRFesp/Paginaprincipal.asp)). Es por tanto, la colección más numerosa y representativa de la diversidad genética local española. La amplia diversidad descrita en esta especie en la Península Ibérica ha llevado a algunos autores a sugerir que constituye un centro de diversidad secundario de esta especie (Santalla *et al.*, 2002).

En el año 2000, De la Rosa *et al.* (2000) proponen una colección nuclear de 211 entradas para la colección de *P. vulgaris* L. reunida en aquel momento en el CRF-INIA (2287 entradas). Esta colección fue establecida a partir del análisis de los datos de pasaporte (provincia, localidad y altura sobre el nivel del mar del lugar de recolección) y de fenotipo de semilla (color, forma y tamaño). Desde que fue propuesta, esta colección no había sido sometida a una caracterización conjunta ni se había profundizado en su conocimiento a fin de disponer de una información mínima que permitiera tanto su utilización como su modificación. Una colección nuclear bien caracterizada y representativa de la diversidad reunida en la colección inicial, proporciona una herramienta de gran valor en la especie tanto para la conservación de la diversidad genética como para los trabajos de evaluación (van Hintum *et al.*, 2000). Las colecciones nucleares son el juego de entradas que preferentemente se conservan y se someten a caracterizaciones y evaluaciones desde diferentes puntos de vista.

### 2.1.4 Objetivos

Los objetivos de este apartado son:

- Profundizar en el conocimiento de la CN-CRF desde un punto de vista morfológico.
- Conocer la estructura de la diversidad genética reunida mediante el empleo de marcadores moleculares.

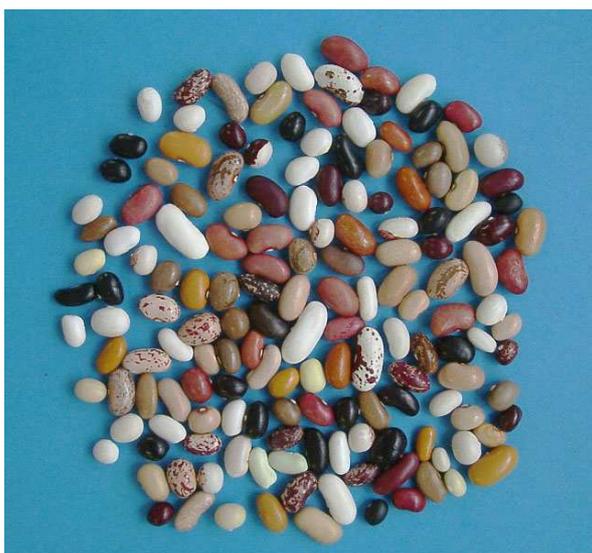
- Definir el grupo de germoplasma al que pertenece cada una de las entradas.
- Contribuir a la actualización de la CN-CRF.

## 2.2 Material y métodos

### 2.2.1 Material vegetal

#### Colección nuclear del CRF-INIA

En este trabajo se analizaron 201 entradas de *Phaseolus vulgaris* L. de las 211 que inicialmente se incluyeron en la colección nuclear del CRF-INIA propuesta por De la Rosa *et al.* (2000). Todas las entradas están conservadas en la CN-CRF del INIA (Madrid) aunque 35 de ellas también se encuentran duplicadas en la colección activa de judías del SERIDA. La CN-CRF fue incorporada a la colección de semillas del SERIDA en 2004 y desde entonces se está manteniendo en dicha colección. La figura 2.1 muestra una semilla de cada una de las accesiones que componen la colección nuclear. Un total de 10 entradas: BGE022811, BGE026247, BGE028943, BGE020065, BGE020089, BGE022825, BGE029584, BGE025104, BGE025106 y BGE027097 no estaban disponibles porque presentaron baja/nula capacidad de germinación y el material existente era escaso.



**Figura 2.1.** Diversidad de fenotipos de semilla presentes en la CN-CRF. Cada semilla representa una entrada multiplicada con éxito en Villaviciosa.

Los datos de pasaporte de las 211 entradas que componen la CN-CRF, se pueden consultar de forma más detallada en el CD que acompaña a esta memoria y en la dirección [www.inia.es/webcrf/CRFesp/Paginaprincipal.asp](http://www.inia.es/webcrf/CRFesp/Paginaprincipal.asp). Cada entrada se identifica con el código del Inventario Nacional de Recursos Fitogenéticos y se nombran con las letras BGE (Banco de Germoplasma Español) seguidas de un número de 6 dígitos. En la figura 2.2 se representa en un mapa de España el número de entradas utilizadas en este trabajo de la CN-CRF distribuidas por Comunidades Autónomas.

Desde su incorporación a la colección SERIDA, se han realizado diversos trabajos sobre la CN-CRF:

- Caracterización asistida por proteínas de semilla como por ejemplo, la faseolina (Pérez - Vega *et al.* 2006b).
- Evaluación de la respuesta frente a cinco raza locales de antracnosis (Pérez - Vega *et al.* 2006a).

Toda la información reunida de cada entrada se encuentra conservada en una base de datos.



**Figura 2.2.** Mapa de España en el que se indica el número de entradas de judía utilizadas en este trabajo presentes en las Comunidades Autónomas y que constituyen la CN-CRF.

### Variedades de referencia

Se utilizaron como testigos en el análisis molecular, 7 variedades de judía común ampliamente conocidas: Michelite, TU, AB136, G2333 y Sanilac que pertenecen al grupo de germoplasma mesoamericano y MDRK y Tendergreen pertenecientes al grupo de germoplasma andino. Además, se incluyeron otras 3 entradas conservadas en la colección del SERIDA: V215 de la especie *P. coccineus* y las entradas silvestres, G13004 (acervo genético andino) y G23415 (acervo genético mesoamericano).

## 2.2.2 Caracterización morfológica

Las 201 entradas de la colección nuclear se sembraron en invernadero en las instalaciones del SERIDA-Villaviciosa, utilizándose entre 8-10 semillas por entrada, en un marco de plantación de 0,6 x 1,4 m y como tutores, varilla de hierro de 12 mm de diámetro y 2,5 m de longitud. El objetivo de la siembra fue tanto la multiplicación como la caracterización mediante descriptores morfológicos sencillos. Posteriormente, con el objeto de aumentar las existencias de cada entrada, se realizaron otras multiplicaciones que también permitieron caracterizar cada entrada al menos dos veces. En esta caracterización, se emplearon 28 descriptores cualitativos sencillos, todos ellos, con una importante componente genética en su expresión. Además, se incluyó el carácter cuantitativo: peso medio de 100 semillas (g) para clasificar las entradas en función del tamaño de las semillas. Estos descriptores (ver tabla 2.1), son los utilizados habitualmente en las caracterizaciones que se realizan en esta especie en el SERIDA (Ferreira *et al.*, 2005), adaptados a partir de las listas de descriptores internacionales propuestas por IBPGR (1982), van Schoohoven y Pastror-Corrales (1987) y la UPOV (1994).

**Tabla 2.1.** Listado de los 29 descriptores empleados en la caracterización morfológica según Ferreira *et al.* (2005).

Descriptores	Clases fenotípicas							
	I	II	III	IV				
<b>Planta/hoja</b>								
Hábito de crecimiento	I	II	III	IV				
Color hipocotilo	Verde	No verde	Mezcla					
Forma foliolo central	Ovalado	Hastado	Acorazonado	Romboédrico	Otros			
<b>Flor/inflorescencia</b>								
Color alas	Blanco	Lila	Violeta					
Color estandarte	Blanco	Lila	Violeta					
Estrías en el estandarte	Presente	Ausente						
Forma bracteola	Ovalada	Triangular	Acorazonada	Lanceolada				
Tamaño bracteola	Mayor cáliz	Igual cáliz	Menor cáliz					
<b>Fruto (vainas)</b>								
Color vaina verdeo	Verde	Amarilla	Verde jaspeada					
Forma vaina	Recta	Ligeramente curva	Curvada	Recurvada				
Sección vaina	Aplanada	En pera	Redondeada	En ocho				
Posición del pico	Marginal	Central						
Forma del pico	Afilado	Romo						
Longitud vaina	< 10 cm	10 - 15 cm	> 15 cm					
Color vaina madura	Amarilla	Amarilla jaspeada	Violácea					
Nº semillas / vaina	2-4	4-6	> 6					
<b>Semilla</b>								
Forma longitudinal	Ovalada	Redonda	Arriñonada	Oblonga				
Forma transversal	Llena	Semillena	Aplanada					
Nº colores	Uno	Dos	Tres					
Brillo	Blillante	Medio	Mate					
Color principal	Blanco	Amarillo	Marrón	Rosado	Púrpura	Negro	Crema	Otros
Color secundario	Crema	Púrpura	Marrón	Gris	Blanco			
Color terciario	Crema	Púrpura	Marrón	Negro				
Distribución de color	Sin dibujo	Mancha hilum	Moteado constante	Rayado	Partida	Punteado		
Proporción color	Uniforme	Mitad	Menos mitad	Más mitad				
Venosidad	Presente	Ausente						
Color hilum	Presente	Ausente						
Tamaño de semilla	Muy grande	Grande	Mediana	Pequeña	Muy pequeña			
<b>Aprovechamiento</b>								
Utilidad para verdeo	Si	No						

Por otro lado, las entradas fueron agrupadas atendiendo a su parecido con las clases comerciales descritas para semilla seca (Santalla *et al.*, 2001). Las entradas que no fueron incluidas en ninguna de estas clases se agruparon en la clase 'Otros'. En aquellas entradas que presentaron aptitud para verdeo (consumo de la vaina inmadura), se consideraron además, las clases comerciales para vaina inmadura propuestas por Campa (2006) y que se muestran en la tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Clases comerciales de vaina inmadura en función de los caracteres sección de la vaina, color y longitud.

Longitud/color	Sección			
	Plana		Redonda	
	Larga	Corta	Larga	Corta
Verde	Plana larga verde	Plana corta verde	Redonda larga verde	Redonda corta verde
Jaspeada	Plana larga jaspeada	Plana corta jaspeada	Redonda larga jaspeada	Redonda corta jaspeada
Amarilla	Plana larga amarilla	Plana corta amarilla	Redonda larga amarilla	Redonda corta amarilla

## 2.2.3 Caracterización asistida por marcadores moleculares

### Obtención de ADN genómico

El ADN genómico se obtuvo de hojas trifoliadas jóvenes frescas procedentes de 5 plantas/entrada. Para la extracción de ADN el tejido se pulverizó con nitrógeno líquido. Se utilizaron entre 0,10-0,15 g de tejido fresco. La extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990) con ligeras modificaciones. El ADN se diluyó en TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH = 8) y se conservó a 4°C para su utilización a corto plazo y a -20°C para su utilización a largo plazo. La concentración de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a 260/280 nm y para la amplificación de ADN se utilizaron alícuotas con una concentración de 10 ng/μl.

### Obtención de marcadores moleculares

A partir del ADN genómico se realizaron amplificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron un total de 11 marcadores localizados en grupos de ligamiento independientes, con un alto nivel de polimorfismo y de fácil lectura e interpretación. Todos estos marcadores presentan una herencia mendeliana sencilla (Campa, 2006). En la Tabla 2.3 se indican los marcadores analizados, el tipo de marcador, el grupo de ligamiento en el que se ubican y la referencia donde se han descrito por primera vez.

**Tabla 2.3.** Marcadores moleculares tipo microsatélite y SCAR utilizados. Se indica el grupo de ligamiento en que se ha ubicado cada marcador (GL) y la referencia de su descripción. Microsatélite = repetición de secuencia simple. SCAR = región amplificada de una secuencia caracterizada.

Marcador	Tipo	GL	Referencia
BMd45	Microsatélite	B1	Blair et al., 2003
BMd17	Microsatélite	B2	Blair et al., 2003
BM172	Microsatélite	B3	Blair et al., 2003
SW12	SCAR	B4	Miklas et al., 2000
BM175	Microsatélite	B5	Blair et al., 2003
BM170	Microsatélite	B6	Blair et al., 2003
BM210	Microsatélite	B7	Blair et al., 2003
BM151	Microsatélite	B8	Blair et al., 2003
BM141	Microsatélite	B9	Blair et al., 2003
SAP6	SCAR	B10	Miklas et al., 2000
BM184	Microsatélite	B11	Blair et al., 2003

Las reacciones de amplificación, se realizaron en un termociclador MJResearch PT100 siguiendo los programas de amplificación descritos por cada autor. Se utilizó el enzima EcoTaq polimerasa (Ecogen) variando las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> según las indicaciones de los respectivos autores. En cada amplificación se incluyeron las variedades de referencia como control.

### Visualización de los productos de amplificación

Los productos derivados de las reacciones de amplificación se separaron, atendiendo a sus pesos moleculares, en dos tipos de geles:

- *Geles de agarosa:* Este tipo de geles se utilizó para los marcadores tipo SCAR y el microsatélite BMd45. Se usaron geles de agarosa a una concentración del 2% (p/v). El producto de amplificación se mezcló con tampón de carga 6x (15% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol) y se sometió a electroforesis con un voltaje constante (50 voltios). Se utilizaron geles de unas dimensiones de 15 x 10 x 0,6 cm. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó tampón TAE 1x (40 mM TRIS, 0,12% ácido acético, 1 mM EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y los fragmentos se visualizaron con luz ultravioleta.

- *Geles de poliacrilamida:* Este tipo de geles resultan más eficaces en la separación de fragmentos de bajo y parecido peso molecular. Se utilizaron en los microsatélites, excepto para el BMd45. Se trata de geles verticales de poliacrilamida al 8% (p/v) en condiciones no desnaturizantes con unas dimensiones de 21 x 18 x 0,1 cm. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó tampón TBE 0,6x (89 mM TRIS, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y los fragmentos se visualizaron con luz ultravioleta.

En ambos casos el tamaño de los fragmentos amplificados se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (100 y 50 pares de bases, Amersham Biosciences) respectivamente y con ayuda del programa informático Photocapt MW 99.03. Las diferentes variantes de cada marcador fueron clasificadas de acuerdo al tamaño de los fragmentos amplificados y por comparación con las variedades de referencia.

## 2.2.4 Agrupamiento del material

Se analizaron las relaciones filogenéticas a partir de una matriz binaria (0,1) elaborada con los resultados obtenidos en la caracterización molecular. La presencia de cada alelo se codificó como 1 y la ausencia como 0. A partir de esta matriz se obtuvo la correspondiente matriz de similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908). El dendrograma se obtuvo a partir de esta matriz de similaridad utilizando el método UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average). Por otra parte, las accesiones se agruparon también, mediante un análisis de los componentes principales (ACP). Las dos variables que explican el mayor porcentaje de variación se utilizaron para obtener una gráfica de dispersión. Ambos tipos de análisis se llevaron a cabo con el programa informático NTSYSpc v 2.1 (Rohlf, 1992).

## 2.2.5 Índices de diversidad

Se utilizaron los índices de Shannon-Wiener y de Simpson para estimar la diversidad de los caracteres morfológicos cualitativos analizados (van Hintum *et al.*, 2000). Ambos índices indican la heterogeneidad de la muestra, es decir, la cantidad y proporción de los diferentes elementos que la componen (Moreno, 2001).

El índice de Shannon-Wiener es un índice de equidad que se define como:

$$H' = - \sum p_i \ln (p_i)$$

El índice de Simpson es un índice de dominancia que se define como:

$$\lambda = \sum p_i^2 \quad \text{ó} \quad 1/\lambda = 1/\sum p_i^2$$

Siendo  $p_i$ , para ambos índices, la frecuencia de cada una de las clases fenotípicas de un carácter. A medida que aumentan los valores  $H'$  y  $1/\lambda$  la diversidad es mayor.

La herencia de los marcadores utilizados (SCAR y microsatélites) había sido analizada previamente en distintas poblaciones segregantes. Por ello, los fragmentos de diferente tamaño observados en los distintos genotipos para cada marcador se consideraron

alelos. La diversidad para cada locus fue calculada utilizando el índice de contenido polimórfico o PIC (polymorphism index content):

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la proporción de individuos que presentan el alelo  $i$ , calculado para cada locus (Anderson *et al.*, 1993).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Resultados de la caracterización morfológica

En el año 2004 todas las entradas disponibles que se habían incluido dentro de la colección nuclear se multiplicaron en invernaderos del SERIDA y se caracterizaron morfológicamente. La tabla 2.4 resume los resultados obtenidos indicando en cada clase fenotípica considerada el número de entradas y la frecuencia de cada clase. Estos resultados se pueden consultar de forma detallada para cada entrada en el CD que acompaña a esta memoria. Los datos obtenidos muestran que en el conjunto de las entradas estudiadas, en mayor o menor frecuencia, están presentes todas las clases fenotípicas establecidas lo que sugiere la existencia de una amplia diversidad genética dentro de la colección nuclear española. Siete entradas: BGE008273, BGE003696, BGE003700, BGE025130, BGE028964, BGE026211 y BGE029592 presentaron mezcla para algún carácter.

La caracterización, pone de manifiesto también, que la mayor parte de las entradas disponen de un fenotipo de planta con un hábito de crecimiento indeterminado tipo IV (57%) y el foliolo central de la hoja de forma ovalado (56%). En cuanto los caracteres de flor destacan aquellas con las alas y el estandarte de color lila (48%). Por lo que respecta a los caracteres de la vaina en estado de verdeo, la mayor parte de las entradas disponen de vaina recta o ligeramente curvada, con sección en forma de pera, de color verde, generalmente con el pico en la posición central y con una longitud no mayor de 15 cm.

**Tabla 2.4.** Resultados de la caracterización morfológica sobre la CN-CRF en base a 29 descriptores morfológicos propuestos por Ferreira *et al.* (2005). Se indica entre paréntesis el número de entradas y la frecuencia dentro de cada clase fenotípica establecida para cada carácter. El total se refiere al número de entradas analizadas para cada descriptor.

Descriptores	Total	Clases fenotípicas (Nº entradas/frecuencia)							
<b>Planta/hoja</b>									
Hábito de crecimiento	201	I (43 / 21,4%)	II (4 / 2,0%)	III (40 / 19,9%)	IV (114 / 56,7%)				
Color hipocotilo	201	Verde (104 / 51,7%)	No verde (94 / 46,8%)	Mezcla (3 / 1,5%)					
Forma foliolo central	201	Ovalado (112 / 55,7%)	Hastado (30 / 14,9%)	Acorazonado (48 / 23,9%)	Romboédrico (10 / 5,0%)	Otros (1 / 0,5%)			
<b>Flor/inflorescencia</b>									
Color alas	201	Blanco (86 / 42,8%)	Lila (96 / 47,8%)	Violeta (18 / 9,0%)	Mezcla (1 / 0,5%)				
Color estandarte	201	Blanco (85 / 42,3%)	Lila (97 / 48,3%)	Violeta (18 / 9,0%)	Mezcla (1 / 0,5%)				
Estrías en el estandarte	201	Presente (15 / 7,5%)	Ausente (186 / 92,5%)						
Forma bracteola	200	Ovalada (88 / 43,8%)	Triangular (16 / 8,0%)	Acorazonada (34 / 16,9%)	Lanceolada (62 / 30,8%)				
Tamaño bracteola	200	Mayor cáliz (105 / 52,2%)	Igual cáliz (83 / 41,3%)	Menor cáliz (12 / 6,0%)					
<b>Fruto (vainas)</b>									
Color vaina verdeo	201	Verde (173 / 86,1%)	Amarilla (21 / 10,4%)	Verde jaspeada (6 / 3,0%)	Mezcla (1 / 0,5%)				
Forma vaina	201	Recta (108 / 53,7%)	Ligeramente curva (58 / 28,9%)	Curvada (31 / 15,4%)	Recurvada (4 / 2,0%)				
Sección vaina	201	Aplanada (49 / 24,4%)	En pera (122 / 60,7%)	Redondeada (27 / 13,4%)	En ocho (3 / 1,5%)				
Posición del pico	201	Marginal (85 / 42,3%)	Central (116 / 57,7%)						
Forma del pico	201	Afilado (107 / 53,25)	Romo (94 / 46,8%)						
Longitud vaina	201	< 10 cm (82 / 40,8%)	10 - 15 cm (83 / 41,3%)	> 15 cm (36 / 17,9%)					
Color vaina madura	201	Amarilla (138 / 68,7%)	Amarilla jaspeada (47 / 23,4%)	Violácea (14 / 7,0%)	Mezcla (2 / 1,0%)				
Nº semillas / vaina	201	2-4 (63 / 31,3%)	4-6 (105 / 52,2%)	> 6 (33 / 16,4%)					
<b>Semilla</b>									
Forma longitudinal	201	Ovalada (75 / 37,3%)	Redonda (16 / 8,0%)	Arriñonada (86 / 42,8%)	Oblonga (24 / 11,9%)				
Forma transversal	201	Llena (101 / 50,2%)	Semillena (80 / 39,8%)	Aplanada (20 / 10,0%)					
Nº colores	201	Uno (143 / 71,1%)	Dos (42 / 20,4%)	Tres (17 / 8,5%)					
Brillo	201	Brillante (70 / 34,8%)	Medio (95 / 47,3%)	Mate (36 / 17,9%)					
Color principal	201	Blanco (52 / 25,9%)	Amarillo (16 / 8,0%)	Marrón (33 / 16,4%)	Rosado (22 / 10,9%)	Púrpura (16 / 8,0%)	Negro (20 / 10,0%)	Crema (33 / 16,4%)	Otros (9 / 4,5%)
Color secundario	42	Crema (15 / 35,7%)	Púrpura (13 / 31,0%)	Marrón (11 / 26,2%)	Gris (2 / 4,8%)	Blanco (1 / 2,4%)			
Color terciario	17	Crema (7 / 41,2%)	Púrpura (7 / 41,2%)	Marrón (2 / 11,8%)	Negro (1 / 5,9%)				
Distribución de color	201	Sin dibujo (159 / 79,1%)	Mancha hilum (11 / 5,5%)	Moteado constante (12 / 6,0%)	Rayado (16 / 8,0%)	Partida (2 / 1,0%)	Punteado (1 / 0,55%)		
Proporción color	201	Uniforme (159 / 79,1%)	Mitad (8 / 4,0%)	Menos mitad (33 / 16,45)					
Venosidad	201	Presente (50 / 24,9%)	Ausente (151 / 75,1%)						
Color hilum	201	Presente (118 / 58,7%)	Ausente (83 / 41,3%)						
Tamaño de semilla	200	Muy grande (13 / 6,5%)	Grande (61 / 30,3%)	Mediana (73 / 36,3%)	Pequeña (49 / 24,4%)	Muy pequeña (4 / 2,0%)			
<b>Aprovechamiento</b>									
Utilidad para verdeo	201	Si (72 / 35,8%)	No (129 / 64,2%)						

En cuanto al fenotipo de semilla se ha constatado la existencia de una gran variación. La mayor parte de las entradas presentan semillas de color blanco, con brillo medio o brillante y con forma longitudinal arriñonada u ovalada. Atendiendo al color principal, la colección estudiada dispone de representantes en todas las clases consideradas, además, aparecen 9 entradas que no están incluidas en ninguna de estas categorías: 7 grises (BGE002209, BGE003165, BGE003554, BGE023180, BGE023190, BGE025142 y BGE028940) y 2 verdes (BGE024024 y BGE0289477). Las entradas con semilla verde se corresponden con una variedad conocida en el norte de España como Verdina o *faba de marisco* cuyo color verdoso es debido a una recolección precoz, cuando la semilla no ha completado su maduración.

También, es de destacar, que 72 entradas (34% del total de la colección) permiten un aprovechamiento en vaina inmadura o en verde (vainas con poca fibra y muy carnosas). La tabla 2.5 muestra las clases comerciales de judías de verdeo identificadas, la mayor parte se clasifican dentro de la clase judía plana larga verde. Solamente 2 clases de las propuestas en la tabla 2.2, redonda corta jaspeada y plana corta jaspeada no están presentes en la colección nuclear española.

**Tabla 2.5.** Número de entradas de la CN-CRF con utilidad para verdeo que muestran parecido con las clases comerciales de judías verdes o fréjoles propuestas por Campa (2006).

Clase comercial	Nº entradas
Plana larga verde	32
Plana larga jaspeada	1
Plana larga amarilla	5
Plana corta verde	17
Plana corta amarilla	1
Redonda larga verde	11
Redonda larga jaspeada	2
Redonda larga amarilla	1
Redonda corta verde	1
Redonda corta amarilla	1

La tabla 2.6 agrupa las diferentes entradas en clases comerciales atendiendo a la semejanza con las clases comerciales de judía grano descritas por Santalla *et al.* (2001). De las 48 clases comerciales descritas por estos autores, dentro de la colección nuclear están presentes 37 siendo el tipo Rosada (19 entradas) y Marrow (11 entradas) las clases más frecuentes. Sin embargo, 46 entradas ('Otros' en la tabla 2.6) no fue posible asociarlas a ninguna clase comercial. Dentro de este grupo 'Otros' se ha identificado una amplia variación en cuanto a fenotipo de planta, vaina y semilla. Atendiendo al fenotipo de semilla, se han establecido al menos 36 clases distintas en el mencionado grupo: 7 subgrupos formados por varias entradas con fenotipo de semilla similar y 29 con una única entrada que representa ese fenotipo de semilla.

**Tabla 2.6.** Número de entradas de la CN-CRF que muestran parecido con las clases comerciales propuestas por Santalla *et al.* (2001). Se indica el fenotipo de semilla representativo de cada clase comercial.

Clase comercial	Nº entradas	Clase comercial	Nº entradas
 Azufrado	4	 Otros 1	2
 Bayo gordo	6	 Otros 2	4
 Black canellini	5	 Otros 3	1
 Black mottled	1	 Otros 4	2
 Black turtle	2	 Otros 5	4
 Brown garbanzo	6	 Otros 6	2
 Brown marrow	2	 Otros 7	1
 Brown mottled	7	 Otros 8	1
 Canario bola	1	 Otros 9	2
 Canela	6	 Otros 10	1
 Canellini	2	 Otros 11	1
 Carioca	1	 Otros 12	1
 Cranberry	3	 Otros 13	1
 Dark garbanzo	3	 Otros 14	1
 Dark red kidney	2	 Otros 15	1
 Fabada	3	 Otros 16	2
 Fabada pinto	1	 Otros 17	1
 Great northern	9	 Otros 18	1
 Kidney caparron	1	 Otros 19	1
 Large cranberry	4	 Otros 20	1
 Large great northern	4	 Otros 21	1
 Large red mottled	1	 Otros 22	1
 Light red kidney	1	 Otros 23	1
 Manteca	2	 Otros 24	1
 Marrow	11	 Otros 25	1
 Mulatinho	2	 Otros 26	1
 Negro brillante	8	 Otros 27	1
 Ojo de cabra	2	 Otros 28	1
 Red caparron	2	 Otros 29	1
 Red pinto	4	 Otros 30	1
 Rosada	19	 Otros 31	1
 Rounded caparron	7	 Otros 32	1
 Sangretero	6	 Otros 33	1
 Small red	1	 Otros 34	1
 Small white	3	 Otros 35	1
 Small yellow	6	 Otros 36	1
 White kidney	6		

En la tabla 2.7 se muestran los grupos de entradas que pertenecen a la misma clase comercial según Santalla *et al.* (2001) y que presentan alto grado de similitud para el conjunto de caracteres morfológicos estudiados. La clase comercial Rosada presente mayoritariamente en la colección es la que tiene mayor número de entradas similares.

**Tabla 2.7.** Entradas de la CN-CRF con alto grado de similitud. Están incluidas en el mismo grupo de fenotipo de semilla y no presentan diferencias en la caracterización morfológica.

Clase comercial	Entradas similares
Rosada	BGE003484 y BGE024038 BGE004496 y BGE028958 BGE025124 y BGE029593
Brown garbanzo	BGE025080 y BGE027076
Bayo gordo	BGE003482 y BGE005440
Fabada	BGE010957 y BGE011016
Great nothern	BGE004026, BGE005484 y BGE028953
Large great nothern	BGE013972 y BGE019991
Negro brillante	BGE004469 y BGE029569
Rounded caparron	BGE002016 y BGE013952
Small yellow	BGE004031 y BGE004435

### 2.3.2 Índices de diversidad

En la tabla 2.8 se presentan los índices diversidad de Shannon-Wiener y de Simpson estimados para los caracteres morfológicos analizados en la CN-CRF. Los valores estimados de estos índices resultan, en general elevados, indicando la importante diversidad reunida en la colección nuclear para los caracteres morfológicos considerados. El índice de Shannon-Wiener osciló entre 1,479 para el carácter color principal de la semilla y 0,265 para la presencia de estrías en el estandarte.

**Tabla 2.8.** Estimación del valor de los índices de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ) y de Simpson ( $1/\lambda$ ) para los caracteres morfológicos analizados en la CN-CRF. Se indican los valores estimados para caracteres de planta, vaina y aprovechamiento y caracteres de semilla.

Descriptores	Índice de Shannon-Wiener ( $H'$ )	Índice de Simpson ( $\lambda$ )
<b>Planta/hoja</b>		
Hábito de crecimiento	1,051	2,454
Color hipocotilo	0,759	2,055
Forma foliolo central	1,127	2,549
<b>Flor/inflorescencia</b>		
Color alas	0,959	2,385
Color estandarte	0,958	2,382
Estrías en el estandarte	0,265	1,160
Forma bracteola	1,226	3,108
Tamaño bracteola	0,873	2,237
<b>Fruto (vainas)</b>		
Color vaina verdeo	0,496	1,329
Forma vaina	1,059	2,524
Sección	0,980	2,242
Posición del pico	0,681	1,954
Forma del pico	0,691	1,992
Longitud vaina verdeo	1,039	2,710
Color vaina madura	0,829	1,883
Nº semillas / vaina	0,999	2,512
<b>Semilla</b>		
Forma longitudinal	1,186	2,916
Forma transversal	0,942	2,376
Nº colores	0,775	1,802
Brillo	1,030	2,654
Color principal	1,479	6,353
Distribución de color	0,713	1,566
Proporción color	0,637	1,528
Venosidad	0,561	1,597
Color hilum	0,678	1,941
Tamaño de semilla	1,329	3,472
<b>Aprovechamiento</b>		
Utilidad para verdeo	0,652	1,851

### 2.3.3 Resultados de la caracterización molecular

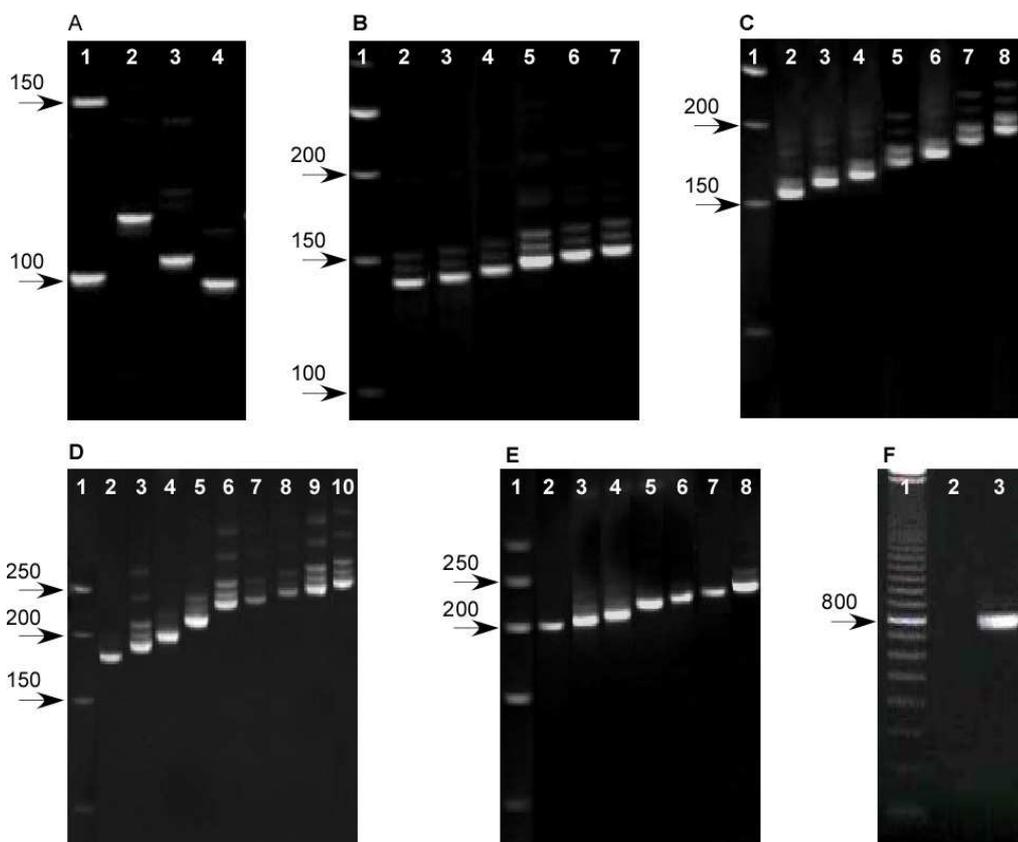
#### Análisis de marcadores moleculares en la CN-CRF

La tabla 2.9 indica, para cada marcador, el número de alelos observados en el material analizado y el valor del índice de contenido de información polimórfica (PIC). La mayor parte de los marcadores presentaron un número de alelos (o variantes) mayor de 6 y un valor de PIC superior a 0,7.

**Tabla 2.9.** Marcadores analizados en la CN-CRF. Se indica en cada caso, el tipo de marcador, el grupo de ligamiento, el rango de peso molecular (pares de bases) que comprenden los diferentes alelos, así como el valor del índice PIC.

Marcador	Tipo	Grupo ligamiento	Nº alelos	Rango peso molecular	PIC
BMd45	Microsatélite	B1	2	150-200	0,47
BMd17	Microsatélite	B2	4	94-120	0,56
BM172	Microsatélite	B3	9	84-119	0,75
Sw12	SCAR	B4	7	475-750	0,56
BM175	Microsatélite	B5	9	162-200	0,76
BM170	Microsatélite	B6	7	200-250	0,79
BM210	Microsatélite	B7	7	160-195	0,70
BM151	Microsatélite	B8	6	136-153	0,71
BM141	Microsatélite	B9	9	185-260	0,81
SAP6	SCAR	B10	2	800	0,44
BM184	Microsatélite	B11	5	150-163	0,76

Se observó un valor medio de 6,1 alelos por marcador (mínimo 2; máximo 9) y un valor medio de PIC de 0,66 (mínimo 0,44; máximo 0,81). Destacan los microsatélites BM210, BM170, BM172, BM141 y BM175, tanto por su elevado PIC como por el número de alelos identificados (>7). En la figura 2.3 se muestran, sobre geles de poliacrilamida o agarosa, algunos de los alelos observados para 6 de los marcadores analizados.

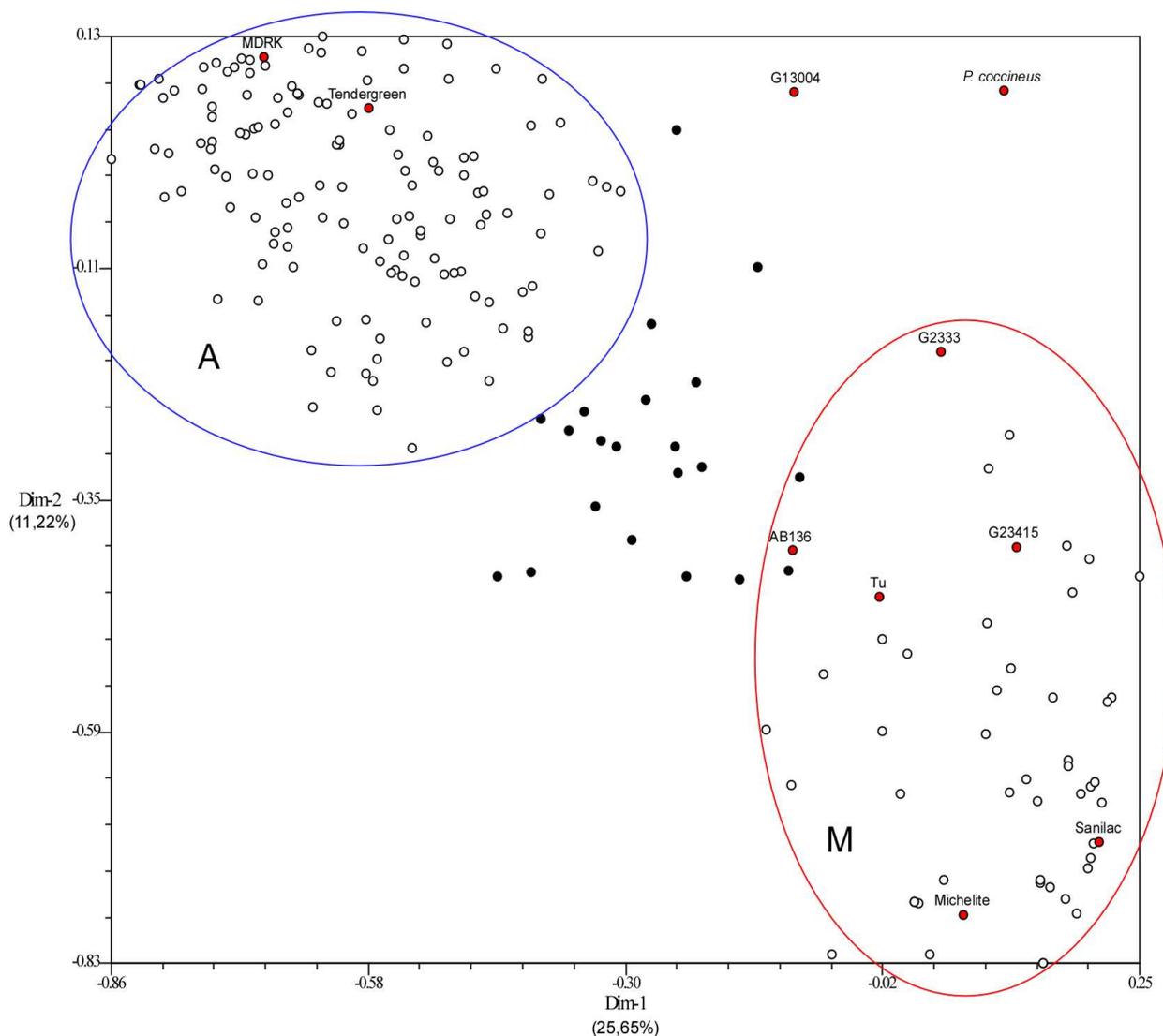


**Figura 2.3.** Alelos observados para algunos de los microsatélites o SCAR analizados. **A, B, C, D, E** geles de poliacrilamida al 8% (p/v) mostrando los alelos encontrados para los microsatélites BMd17 (A), BM151 (B), BM210 (C), BM141(D) y BM170 (E). **F**, gel de agarosa al 1% (p/v) con los alelos del SCAR SAP6. En todos los casos la calle 1 muestra el marcador de peso molecular, de 50 pb en las figuras A, B, C, D, y E, y de 100 pb en la figura F. En las calles 2 a la 10 aparecen diferentes entradas de la CN-CRF.

### Análisis de las relaciones filogenéticas

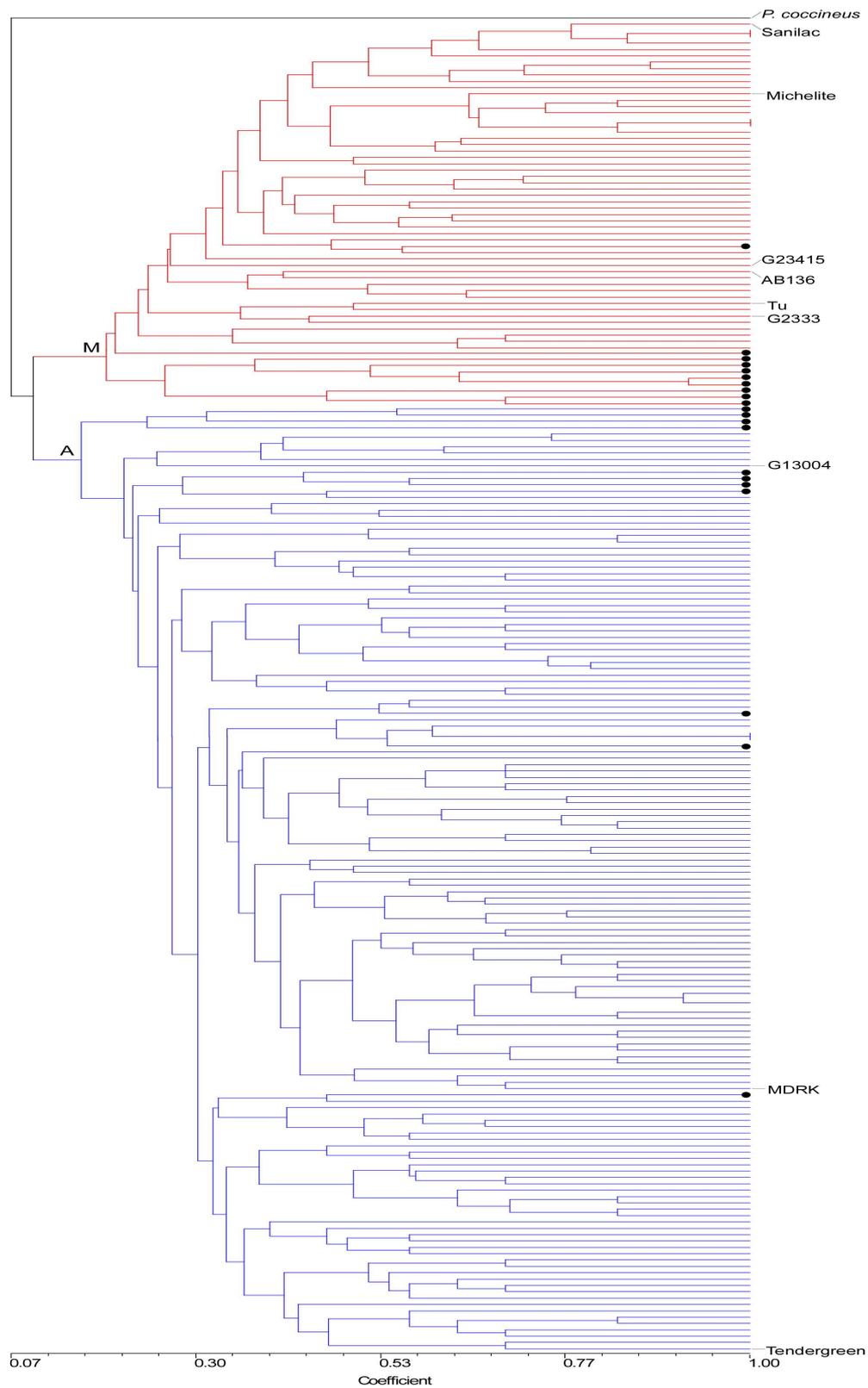
A partir de los datos obtenidos para cada entrada y para cada marcador (matriz de datos 0, 1) se realizó un análisis de componentes principales con el fin de reducir el número de variables e identificar agrupamientos entre los materiales. Mediante este análisis, se encontraron dos variables que explican el 36,87% de la varianza: la variable 1 (Dim-1) explica el 25,65% y la variable 2 (Dim-2) explica el 11,22% de la varianza. Considerando una tercera variable (Dim-3), los resultados no cambian significativamente porque sólo explica el 5,11%. La figura 2.4 representa, en una gráfica de dispersión, la disposición de cada entrada analizada en función de estas dos nuevas variables. En esta representación se observa que aparecen dos grupos principales, uno en el extremo superior izquierdo (A) y otro en el extremo inferior derecho (M). Considerando la posición de las variedades testigo, un grupo podría considerarse como germoplasma andino (superior izquierdo) y otro como germoplasma mesoamericano (inferior derecho). Entre ambos grupos aparecen una serie de entradas que ocupan una posición ambigua. El testigo silvestre andino y la especie *Phaseolus*

*coccineus* L. (V215) se separan del resto de materiales. La mayoría de las entradas están próximas al grupo de germoplasma andino.



**Figura 2.4.** Gráfica de dispersión obtenida a partir de las dos principales variables (Dim-1 y Dim-2) derivadas del análisis de componentes principales en base a los datos moleculares de 11 marcadores en 201 entradas de la CN-CRF y 10 variedades testigo. El análisis permite establecer dos grupos de materiales que teniendo en cuenta la posición que ocupan las variedades testigo podrían considerarse que pertenecen al grupo de germoplasma andino o mesoamericano. Cada punto representa una entrada. Se indican en rojo las variedades utilizadas de referencia. El círculo azul señala los materiales que podrían pertenecer al germoplasma andino (A) y el círculo rojo los que podrían pertenecer al germoplasma mesoamericano (M). Los puntos negros representan las entradas que se localizan en una posición ambigua.

Por otra parte, las entradas fueron agrupadas en un dendrograma obtenido mediante el método UPGMA y a partir del índice de similitud de Jaccard (1908). En la figura 2.5 se representa el dendrograma, que puede verse con el nombre de cada entrada en el CD que acompaña a esta memoria.



**Figura 2.5.** Dendrograma obtenido utilizando la distancia de Jaccard y el método de agrupación UPGMA a partir del análisis de 11 marcadores moleculares en 201 entradas de la CN-CRF y en 10 variedades testigo. Cada final de línea se corresponde con una entrada y se señalan las variedades testigo y *P. coccineus*. Las entradas representadas con un punto negro, se corresponden con las señaladas del mismo modo, en la gráfica de dispersión obtenida a partir del análisis de componentes principales.

En este dendrograma, se observa como la especie *P. coccineus* se separa del resto del material analizado (valor del índice de similitud = 0,084), ya que generalmente presentó alelos muy diferentes a *Phaseolus vulgaris* L. El material de *P. vulgaris* se organizó en dos grandes grupos que, por la posición de las variedades de referencia podrían ser asignados a los dos principales grupos de germoplasma:

**Grupo mesoamericano:** constituido por 56 entradas, incluye las variedades de referencia descritas como de origen mesoamericano (Sanilac, Michelite, TU, AB136, G2333 y el silvestre de esta procedencia G23415). Dentro de este grupo aparecen los tipos comerciales: Bayo gordo (1 entrada), Black turtle (2), Brown garbanzo (1), Brown marrow (2), Brown motled (5), Carioca (1), Great northern (9), Large great northern (3), Fabada (3), Marrow (2), Manteca (1), Rosada (3), Small yellow (3), Sangretoro (1), Small white (3) y Otros (16 entradas; subgrupos: 1, 6, 10, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 32, 35 y 36).

**Grupo andino:** constituido por 145 entradas, incluye las variedades de referencia consideradas de origen andino (Tendergreen, MDRK y el silvestre de esta procedencia G13004). Dentro de este subgrupo aparecen las clases comerciales: Azufrado (4 entradas), Black canellini (4), Bayo gordo (6), Black mottled (1), Brown garbanzo (2), Brown marrow (2), Brown motled (1), Canario bola (1), Canela (5), Canellini (2), Cramberry (4), Dark garbanzo (3), Dark red kidney (2), Fabada pinto (1), Great northern (2), Kidney caparron (1), Large cranberry (4), Large great northern (1), Light red kidney (1), Large red mottled (1), Marrow (9), Manteca (1), Mulatinho (2), Negro brillante (8), Ojo de cabra (2), Red caparron (3), Red pinto (4), Rosada (15), Rounded caparron (7), Sangretoro (5), Small red (1), Small yellow (3), White kidney (6) y Otros (31 entradas, subgrupos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 24, 25, 28, 30, 31, 33 y 34).

Las entradas que ocupaban una posición ambigua entre los dos grupos de germoplasma en la representación del análisis de componentes principales (ver figura 2.4), se han incluido en el grupo andino o mesoamericano de acuerdo a su posición en el dendrograma. En su mayoría, estas entradas (representadas con un punto negro), aparecen agrupadas (ver figura 2.5).

Finalmente, estos resultados muestran que hay muy pocos grupos de entradas idénticas, ya que la mayor parte ellas presentaron diferencias en el patrón de amplificación de los marcadores analizados, para un valor de índice de similitud menor de 1. En la tabla 2.10 se indican los grupos de entradas que no presentaron diferencias en el patrón molecular para los marcadores analizados (valor del índice de Jaccard = 1). Por otro lado, considerando un valor del índice de similitud  $\geq 0,77$ , las entradas difieren en 1 o 2 alelos en el patrón de amplificación. La pareja de entradas BGE010957 y BGE011016 del tipo comercial Fabada

comparte el 99% del patrón de amplificación (sólo difieren en 1 alelo); en el resto de los casos los grupos de entradas se diferencian en 2 alelos.

**Tabla 2.10.** Grupos de entradas de la CN-CRF que no presentan diferencias en al menos el 98% en el patrón molecular para los marcadores analizados (valores del Índice de Jaccard  $\geq 0,77$ ).

Índice de Jaccard	Entradas colección nuclear CRF-INIA
1	BGE002108 y BGE008272 BGE022508 y BGE022512 BGE003283 y BGE003645 BGE022476 y BGE022494
$\geq 0,77$	BGE010957 y BGE011016 BGE002108, BGE008273 y BGE011758 BGE022508, BGE022512 y BGE025080 BGE003283, BGE003645 y BGE026166 BGE004453 y BGE005475 BGE000993 y BGE001472 BGE024699 y BGE011060 BGE004469 y BGE005487 BGE026211 y BGE013952 BGE002116 y BGE004445 BGR003121 y BGE029705 BGE003261 y BGE003626 BGE003203 y BGE029604 BGE029593 y BGE026151 BGE013964 y BGE004432 BGE001452 y BGE022070 BGE010387 y BGE003128 BGE003654 y BGE004025 BGE001856 y BGE003079 BGE003208 y BGE003246

Por otro lado se investigó la asociación entre cada uno de los marcadores moleculares y morfológicos y el grupo de germoplasma. En la tabla 2.11 se muestran las frecuencias de las distintas variantes encontradas para cada marcador en función del grupo de germoplasma. Se indica la posible diferencia significativa mediante el test de Chi-cuadrado de contingencia. No se han encontrado marcadores moleculares exclusivos de grupos de germoplasma, aunque aparecen diferencias significativas tanto para la faseolina como para el resto de los marcadores y los dos grupos de germoplasma, es decir, determinados alelos se encuentran preferentemente en un determinado grupo de germoplasma. Por ejemplo, en el marcador BMd45 el alelo de 200 pb se encuentra preferentemente en el germoplasma andino mientras que el alelo 150 pb se encuentra preferentemente en el grupo de germoplasma mesoamericano.

**Tabla 2.11.** Frecuencias de las distintas variantes encontradas para cada marcador en función del grupo de germoplasma. Se indican las variedades de referencia que presentan el alelo de cada marcador. Se señala la posible diferencia significativa mediante el test de Chi-cuadrado de contingencia  $p \leq 0,01^{**}$   $0,01 > p \leq 0,05^*$  ns  $p > 0,05$ .

Marker	Tamaño (pb)	Andino		Mesoamericano		$\chi^2$	p
		Observados	Esperados	Observados	Esperados		
SAP6	-	126	100,8	23	48,2	67,26	**
	800	16	41,2	45	19,8		
Sw12	-	108	89,0	15	34,0	44,32	**
	475	0	2,2	3	0,8		
	550	9	13,7	10	5,3		
	600	4	8,0	7	3,0		
	700	9	13,7	10	5,3		
	725	14	15,2	7	5,8		
	750	5	7,2	5	2,8		
BMd17	94	4	8,5	8	3,5	60,86	**
	105	96	70,7	4	29,3		
	120	47	67,8	49	28,2		
BM184	150	4	32,6	42	13,4	113,67	**
	155	22	18,4	4	7,6		
	157	54	46,1	11	18,9		
	160	50	36,9	2	15,1		
	163	16	12,0	1	5,0		
BM151	142	4	3,6	1	1,4	13,29	**
	145	18	17,1	6	6,9		
	148	62	51,9	11	21,1		
	150	45	54,1	31	21,9		
	153	19	21,3	11	8,7		
BMd45	150	20	54,0	55	21,0	121,37	**
	200	127	93,0	2	36,0		
BM210	165	80	63,8	8	24,2	120,18	**
	170	56	42,8	3	16,2		
	178	7	11,6	9	4,4		
	183	1	16,7	22	6,3		
	188	1	7,3	9	2,8		
	195	0	2,9	4	1,1		
BM170	-	8	5,6	0	2,4	46,90	**
	200	17	24	17	10		
	210	16	26,8	22	11,2		
	220	11	14,1	9	5,9		
	230	64	48,7	5	20,3		
	240	26	21,9	5	9,1		
	250	4	4,9	3	2,1		
BM172	84	2	1,4	0	0,6	155,05	**
	87	0	5,7	8	2,3		
	89	0	2,1	3	0,9		
	91	81	58,9	2	24,1		
	96	7	36,2	44	14,8		
	98	10	7,1	0	2,9		
	110	29	8,4	0	8,4		
	119	20	17	4	7		
	BM141	185	1	0,7	0		
190		0	0,7	1	0,3		
195		2	22	29	9		
218		14	25,5	22	10,5		
240		42	32,6	4	13,4		
243		54	41,1	4	16,9		
245		23	16,3	0	6,7		
248		8	6,4	1	2,6		
260		3	2,1	0	0,9		
BM175		170	5	24,7	30	10,3	132,94
	173	8	16,2	15	6,8		
	180	21	15,5	1	6,5		
	185	85	60,7	1	25,3		
	190	24	18,3	2	7,7		
	195	2	7,1	8	2,9		
	198	1	1,4	1	0,6		
	200	0	2,1	3	0,9		
Faseolina	A	8	5,7	0	2,3	113,22	**
	C	81	62,5	6	24,5		
	H	3	2,2	0	0,8		
	S	3	30,2	39	11,8		
	T	49	42,4	10	16,6		

En la tabla 2.12 se muestran las frecuencias de las distintas clases analizadas para algunos caracteres morfológicos y para cada grupo de germoplasma. Se indica la posible diferencia significativa mediante el test de Chi-cuadrado de contingencia. Los caracteres morfológicos: forma del foliolo central de la hoja, presencia de estrías en el estandarte, forma de la bracteola, posición del pico de la vaina y tamaño de la semilla se han asociado tradicionalmente a grupos de germoplasma particulares (Singh *et al.*, 1991).

No se han encontrado caracteres morfológicos exclusivos de grupos de germoplasma. Dos caracteres: estrías en el estandarte y posición del pico no muestran unas frecuencias significativas entre grupos de germoplasma. Sí aparecen diferencias significativas para la forma del foliolo central de la hoja, la forma de la bracteola y el tamaño de la semilla y los dos grupos de germoplasma.

**Tabla 2.12.** Frecuencias de las clases analizadas para cinco caracteres morfológicos asociados a grupos de germoplasma (Singh *et al.*, 1991). Se señala la posible diferencia significativa mediante el test de Chi-cuadrado de contingencia  $p \leq 0,01^{**}$   $0,01 > p \leq 0,05^*$  ns  $p > 0,05$ .

Carácter		Andino		Mesoamericano		$\chi^2$	p
		Observados	Esperados	Obsrvados	Esperados		
Forma foliolo central de la hoja	Ovalado	83	81,8	29	30,2	18,9	**
	Hastado	30	21,9	0	8,1		
	Acorazonado	27	35,0	21	13,0		
	Romboédrico	6	7,3	4	2,7		
Estrías estandarte	Si	136	135,0	49	50,0	0,3	ns
	No	10	11,0	5	4,1		
Forma bracteola	Ovalada	69	64,6	19	23,4	29,0	**
	Triangular	12	11,7	4	4,3		
	Acorazonada	12	24,2	21	8,8		
	Lanceolada	53	45,5	9	16,5		
Posición pico	Marginal	87	84,7	29	31,3	0,6	ns
	Central	59	61,3	25	22,7		
Tamaño semilla	Muy grande	10	9,5	3	3,5	48,5	**
	Grande	59	44,5	2	16,5		
	Mediana	56	53,3	17	19,7		
	Pequeña	20	35,8	29	13,2		
	Muy pequeña	1	2,9	3	1,1		

## 2.4 Discusión

La judía común es una especie extraordinariamente polimórfica para distintos caracteres morfológicos. En la caracterización de esta especie, se describen multitud de alternativas o clases y las combinaciones que existen entre ellas son numerosas. Por ejemplo, el polimorfismo de la semilla afecta al color, la forma, las dimensiones y la distribución del color. Así, se han descrito al menos 48 clases comerciales (Voysest, 2000; Santalla *et al.*, 2001) y además numerosos fenotipos de semilla distintos.

Los resultados de esta caracterización morfológica ponen de manifiesto la amplia diversidad genética presente en el material analizado ya que, en mayor o menor medida están representadas todas las clases fenotípicas y el número de clases con muy pocos representantes es muy escaso (ver tabla 2.4). Los elevados valores obtenidos para los índices de Shannon-Wiener y Simpson (ver tabla 2.8), en la mayoría de los caracteres, reflejan esta diversidad también puesta de manifiesto en los trabajos pioneros de Puerta Romero (1961) o en trabajos más recientes (Santalla *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005). La elevada diversidad genética local conservada en la CN-CRF, fruto de numerosas prospecciones por el territorio nacional, puede ser consecuencia de diferentes procesos:

- a) Una introducción continua de germoplasma local procedente de otras partes del mundo y posterior selección/adaptación por parte del medio y de los agricultores.
- b) Un proceso de adopción, por parte de los agricultores, de variedades comerciales sobre todo en las entradas de judía de verdeo.
- c) Una hibridación natural que haya generado nuevas combinaciones genéticas seguida de una selección por parte del medio y de los agricultores locales.

La caracterización morfológica es el primer paso en la descripción de un material y puede realizarse con mayor o menor detalle. Para la caracterización morfológica llevada a cabo en este trabajo, se utilizaron los descriptores empleados habitualmente en las caracterizaciones de judía en el SERIDA (Ferreira *et al.*, 2005). Se trata de descriptores cualitativos con una importante base genética en su expresión (véase Lista de genes de *Phaseolus vulgaris* L.; Bassett, 2004). Estos descriptores resultaron sencillos, objetivos y rápidos de tomar, con pocas clases objetivas y de interés en la especie. El juego de caracteres se ha revelado muy eficaz en la descripción y diferenciación de la diversidad reunida, sin recurrir a tediosos caracteres cuantitativos como dimensiones de vainas, dimensiones de semilla, fenología... con mayor o menor influencia ambiental (véase apartado 3 de esta memoria).

Algunos de los caracteres morfológicos empleados en este trabajo, como la forma del foliolo central de la hoja, forma de la bracteola, posición del pico de la vaina, presencia de estrías en el estandarte y tamaño de la semilla se han asociado a grupos de germoplasma (Singh *et al.*, 1991). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta caracterización plantean dificultades para asignar las entradas a los grupos de germoplasma en base a descriptores morfológicos (ver tabla 2.12). Un ejemplo de esta situación es el tipo comercial Fabada (BGE010957, BGE011016 y BGE027962) que muestra caracteres morfológicos típicos de materiales mesoamericanos (foliolo central ovalado o acorazonado, pico de la vaina en posición ventral y bracteola ovalada) y caracteres típicos de materiales andinos (pilosidad en las hojas, entrenudos largos y semilla muy grande). Estos resultados sugieren que la asignación de un material a un grupo de germoplasma no debería realizarse exclusivamente atendiendo a caracteres morfológicos.

La agrupación de las semillas atendiendo a su parecido con las clases comerciales también refleja la importante diversidad genética presente en la colección nuclear analizada puesto que de las 48 clases propuestas encontramos 37 dentro del material estudiado (ver tabla 2.6). Así mismo, se identificaron un total de 46 entradas cuyo fenotipo de semilla no se ajusta a estas clases comerciales y que constituyen 36 fenotipos de semilla distintos. Las clases comerciales más frecuentes son Rosada, Marrow, Great northern y Negro brillante. Además, dentro de este juego de entradas están presentes los principales tipos varietales cultivados en España como Fabada, Verdina, Tolosana, Riñón, Granjina o Canellini, Canela, Arrocinca, Negrito, Palmeña, Manto de la virgen y Canario muchas de ellas descritas previamente (Puerta Romero 1961; Asensio *et al.*, 1990; Reinoso *et al.*, 2007). Finalmente, esta caracterización de las entradas evidencia la ausencia en la colección analizada, de al menos dos fenotipos de semilla de judía importantes en España; por una parte el tipo Hen eye que sí está presente en la colección del SERIDA (entradas V211 y V294) y el tipo Hook o Ganxet característico de Cataluña (la entrada BGE001145 que figura en los datos de pasaporte como Ganxet no se ajusta a este fenotipo de semilla). La inclusión de estos 2 tipos en la colección debería ser considerada a corto plazo.

Para desarrollar este trabajo se ha buscado disponer de marcadores altamente variables como los microsatélites aunque en el caso de los grupos de ligamiento B4 y B10 se ha tenido que recurrir a marcadores tipo SCAR por el reducido número de marcadores tipo microsatélite disponibles (Blair *et al.*, 2003). Además los marcadores moleculares utilizados, presentan una herencia conocida y sencilla (Campa, 2006), no están influenciados por el ambiente y son fáciles de interpretar (presencia/ausencia). Los resultados obtenidos indican que los 11 marcadores moleculares utilizados (SAP6, SW12, BMd17, BM184, BM151, BM170, BMd45, BM210, BM172, BM141 y BM175) resultaron altamente eficaces para la diferenciación del material analizado. La mayor parte de ellos presentaron un número de

alelos mayor de 6 y un valor de PIC superior a 0,7. Para llevar a cabo estudios de diversidad, es deseable disponer de marcadores con un valor elevado de PIC, es decir, con numerosos alelos que se distribuyen homogéneamente en el material analizado (Prasad *et al.*, 2000; Elía *et al.*, 2004). Campa (2006) utilizó este juego de marcadores en el análisis de entradas conservadas en la colección SERIDA identificando más de 70 genotipos diferentes. Blair *et al.* (2003) en un análisis de 44 variedades de judía utilizó 9 microsatélites comunes con este trabajo (BMd17, BM184, BM151, BMd45, BM170, BM210, BM172, BM141 y BM175), en general, el número de alelos y los valores de PIC que encontró fueron más elevados. La diferencia en el número de alelos detectada puede explicarse por los genotipos analizados (variedades internacionales frente a materiales locales de España). Esto confirma el potencial de este grupo de marcadores en el análisis de diversidad dentro de la especie.

En cuanto a la estructura y organización de la diversidad genética, los resultados proporcionados tanto por el análisis de componentes principales como por el dendrograma (ver figuras 2.4 y 2.5) muestran la existencia de dos grandes grupos de germoplasma dentro del material analizado. Utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares (RAPDs, AFLPs, microsatélites) también ha sido posible identificar estos dos acervos genéticos, tanto en materiales cultivados como domesticados (Tohme *et al.*, 1996; Papa y Gepts, 2003; Blair *et al.*, 2006a). A partir de la localización de las variedades testigo es posible relacionar estos grupos con los acervos genéticos andino y mesoamericano. Este resultado es coherente con lo descrito por otros autores que analizan materiales locales españoles y que también encuentran la presencia de estos dos grandes grupos de germoplasma (Casquero, 1997; Santalla *et al.*, 2002; Campa *et al.*, 2006). Todo esto confirma el potencial de este juego de marcadores en la asignación de un material a un grupo de germoplasma. Además, la presencia de estos dos acervos genéticos (andino y mesoamericano) coincide con los resultados obtenidos con otro tipo de marcador genético, la faseolina, una proteína de semilla ampliamente utilizada en esta especie en estudios evolutivos (Gepts *et al.*, 1986; Gepts y Bliss, 1988; Gepts, 1990). En el análisis de estas entradas recolectadas en la Península Ibérica se ha encontrado una mayor frecuencia de faseolina tipo T o C, asociada con germoplasma de origen andino (Gepts y Bliss, 1988; Santalla *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el tipo de faseolina no siempre se relaciona con el grupo de germoplasma (véase tabla 2.12). Así, por ejemplo en el grupo de germoplasma andino se localizan tres entradas (BGE004031, BGE004435 y BGE022832) con faseolina tipo S, generalmente asociada a materiales mesoamericanos. Estos resultados sugieren que la asignación de un material a un grupo de germoplasma no debería realizarse exclusivamente atendiendo al tipo de faseolina.

Los resultados muestran que entradas incluidas dentro de la misma clase comercial pueden pertenecer a cualquiera de los dos grupos de germoplasma, sugiriendo que la

aparición de estas variedades es posterior a la domesticación inicial. Es el caso de las clases comerciales Bayo gordo, Brown garbanzo, Brown marrow, Brown mottled, Great northern, Large great northern, Manteca, Marrow, Rosada, Sangreoro y Small yellow, que se incluyen tanto en el grupo andino como en el mesoamericano. También los resultados ofrecidos por los marcadores moleculares ponen de manifiesto la variación existente dentro de las clases comerciales establecidas, lo que podría ser debido a que esta agrupación se basa únicamente en el fenotipo de semilla.

Por otro lado, tanto el análisis de componentes principales como el dendrograma obtenido mediante el método de agrupación UPGMA (ver figuras 2.4 y 2.5) revelan la existencia de entradas con una posición ambigua entre los dos grupos de germoplasma. Dichas entradas podrían considerarse fruto de la introgresión entre ambos acervos genéticos derivada de hibridaciones. En situaciones en las que convive el cultivo de materiales de grupos de germoplasma diferentes, bien silvestre y cultivado, o bien andino y mesoamericano, se ha descrito un flujo de genes o introgresiones que ha conducido a la aparición de formas intermedias o recombinantes (Johns *et al.*, 1997; Papa y Gepts, 2003; Duran *et al.*, 2005; Zizumbo-Villareal *et al.*, 2005). En cuanto al origen de estos materiales intermedios, la hipótesis de una hibridación natural entre materiales de ambos acervos genéticos presenta algunas dificultades como:

a) La baja tasa de alogamia descrita en la especie, generalmente por debajo del 1% (Ferreira *et al.*, 2000).

b) Los problemas de expresión de letales descritos en cruzamientos entre ambos acervos genéticos que dificultan la viabilidad de tales híbridos (Singh y Gutiérrez, 1984; Gepts y Bliss, 1985).

c) La selección del material de siembra por parte de los agricultores que generalmente descartan las semillas fuera de tipo. Esta selección no sería posible si no aparecen marcadores morfológicos que diferencien los híbridos como por ejemplo, en cruzamientos entre materiales con semilla blanca.

Finalmente, los resultados de este trabajo aportan información acerca del origen de las clases comerciales de importancia culinaria en España. Por ejemplo, dos clases comerciales de importancia en la comunidad de Castilla y León como son el tipo Riñón (White kidney) o el tipo Canela aparecen incluidas dentro del germoplasma andino. Por otro lado, en el caso de la clase comercial Fabada, las tres entradas (BGE010957, BGE011016 y BGE027962) aparecen en el grupo de entradas que ocupan una posición intermedia. Dicha posición, se ve apoyada con que no se han detectado problemas en los cruzamientos de este material con materiales de procedencia mesoamericana. Sin embargo, en el análisis efectuado por Campa

(2006), utilizando los mismos marcadores moleculares, dos entradas de la clase comercial Fabada (V143 y V154, colección SERIDA) aparecen claramente incluidas en el grupo andino. Dado el interés que presenta la clase comercial Fabada en Asturias, estos resultados sugieren la necesidad de profundizar en este tipo de análisis dentro de este grupo comercial.

Para que una colección nuclear cumpla su función (representar la diversidad reunida en una colección de germoplasma), las entradas que la integran podrían revisarse periódicamente proponiendo tanto la incorporación de nuevas entradas como la salida de alguna de ellas. La colección nuclear estudiada en este trabajo fue propuesta en el año 2000 cuando la colección de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) del CRF-INIA disponía de 2287 entradas. En los últimos años se han incorporado nuevas accesiones en dicha colección, de modo que actualmente se conservan en la colección activa de dicha especie un total de 2472 entradas recolectadas en España (De la Rosa, comunicación personal). La existencia de nuevas incorporaciones, hace necesario revisar el conjunto de esas nuevas entradas a fin de identificar posibles materiales susceptibles de ser incluidos en la CN-CRF. Por otro lado, continuando con los mismos criterios geográficos con los que se seleccionaron las entradas que constituyen la actual colección nuclear española se debería hacer un esfuerzo para incorporar entradas de áreas pobremente representadas. Analizando los datos de pasaporte, se observa que en esta colección se incluyen entradas procedentes de las 17 comunidades autónomas, aunque resulta llamativa la desigual contribución de alguna de ellas, donde la superficie destinada a este cultivo es significativa. Tal puede ser el caso de las comunidades autónomas de Andalucía, Canarias, Cataluña y Murcia representadas con 7, 2, 2 y 1 entradas respectivamente. En otros casos, el número de entradas que representan determinadas comunidades autónomas resulta sorprendentemente elevado como es el caso de Castilla y León o Asturias con 52 y 38 entradas respectivamente. En todo caso, lo que refleja esta distribución es la composición de la CN-CRF en el momento de proponerse esta colección nuclear.

Una modificación de la colección nuclear también puede suponer descartar algunas entradas con el objetivo de representar el máximo de diversidad con el mínimo de entradas. Para descartar entradas de la CN-CRF, son de enorme utilidad los datos derivados de este trabajo. Los resultados aportados tanto por la caracterización morfológica como molecular sugieren la existencia de entradas muy similares (véase tabla 2.7 y 2.9). Los resultados proporcionados por los marcadores moleculares señalan, que la mayor parte de las entradas difieren en más del 98% para el patrón molecular analizado. Sólo en 4 casos no se han encontrado diferencias a nivel molecular (índice de similitud de Jaccard = 1): BGE002108 y BGE008272, BGE022508 y BGE022512, BGE003283 y BGE003645, BGE022476 y BGE022494. Sin embargo, estas entradas presentan fenotipos de semilla distintos aunque representados en otras accesiones. Si se consideran ambos criterios por separado y se

incluyen las 7 entradas que presentaron mezcla para algún carácter y las 10 entradas que no germinaron se podrían eliminar de la colección nuclear un total de 33 entradas sin que los índices de diversidad se modifiquen significativamente.

**3.\_ Evaluación agronómica y de calidad de nuevas líneas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) desarrolladas en el SERIDA**

---



## 3.1. Introducción

### 3.1.1 Tipo comercial faba Granja Asturiana

El tipo faba Granja Asturiana es el material más ampliamente cultivado en Asturias y en otras regiones del norte de España. Se caracteriza por poseer un hábito de crecimiento indeterminado (tipo IV), una semilla blanca, oblonga, recta y con un peso medio superior a 100 g/100 semillas (Ferreira *et al.*, 2005). Estas características de semilla hacen que este material sea único dentro de la especie *Phaseolus vulgaris* L. y dentro de las variedades locales españolas (Puerta Romero, 1961; Pérez-Vega *et al.*, 2006b). Sus características de semilla se corresponden con el tipo comercial Fabada (Voyses, 2000; Santalla *et al.*, 2001). Los datos estadísticos indican que en los últimos años en Asturias ha generado más de  $7 \cdot 10^6$  €/año ([www.sadei.es](http://www.sadei.es)) ocupando una superficie de 738 ha en 2005 ([www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechosyfiguras/cifras.htm](http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/hechosyfiguras/cifras.htm)). Además, detrás de este cultivo existe una creciente industria agroalimentaria y turística que utiliza esta legumbre como materia prima en sus diferentes ofertas. La propuesta comercial de este material es muy diversa y abarca desde diferentes presentaciones en semilla seca hasta precocinados (véase por ejemplo, [www.faba-asturiana.org/principal.htm](http://www.faba-asturiana.org/principal.htm)). Esta variedad goza de un reconocido prestigio nacional en cuanto a su calidad y es altamente valorada en el mercado (alrededor de 9 €/kg en la campaña de 2006). En este punto, debe tenerse presente que la semilla de faba Granja es el ingrediente esencial de la fabada (véase figura 3.1) y de sus variantes gastronómicas. Además, el cultivo de faba Granja goza de una Indicación Geográfica Protegida (Orden 6-7/1990, BOE Nº 170 17/7/1990) amparada por el Consejo Regulador de la Denominación Específica “Faba Asturiana”.



**Figura 3.1.** A. Semillas de faba Granja Asturiana. B. Detalle del plato regional característico de Asturias, la fabada.

### 3.1.2 Programas de mejora genética: objetivos y variedades desarrolladas

Entre los problemas que mayor incidencia tienen en el rendimiento final del cultivo del tipo faba Granja en el norte de España se pueden destacar la susceptibilidad a las razas locales de antracnosis, a potyvirus (BCMV y BCMNV) y la arquitectura trepadora de la planta.

#### **Antracnosis**

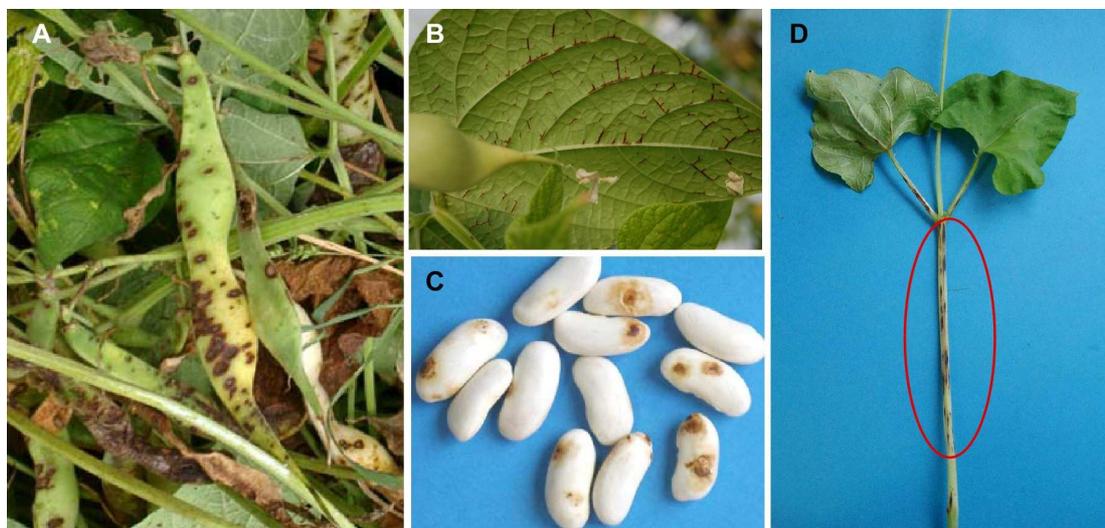
La antracnosis, producida por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. y Cav. es una enfermedad que puede llegar a afectar de forma grave a la especie *Phaseolus vulgaris* L., especialmente en situaciones de temperaturas templadas y alta humedad ambiental (Pastor-Corrales y Tu, 1994). Se caracteriza por presentar síntomas que comienzan siendo pequeñas lesiones cóncavas sobre el tallo y/o las hojas (ver figura 3.2). Sobre las hojas se observan necrosis en las venas principales que irradian hacia las secundarias. Si la enfermedad progresa, las lesiones se convierten en chancros oscuros que pueden llegar a colapsar los diferentes tejidos y matar la planta en estadios juveniles. Si la planta no muere y produce vainas, los síntomas de la enfermedad aparecen como chancros oscuros cóncavos que pueden tener coloración rosácea debido a la producción de esporas. Sobre las semillas aparecen unas manchas oscuras características, especialmente visibles sobre semillas blancas, que disminuyen de forma notable el rendimiento económico del cultivo. Este hongo, es el principal responsable del manchado de la semilla.

Se han recomendado diferentes medidas de control para esta enfermedad, como la utilización de semillas libres de patógeno, desinfección del material de siembra con fungicidas, rotación de cultivos y tratamientos con diferentes fungicidas a lo largo del cultivo (Tu, 1988; Hall y Nasser, 1996). Estas medidas ofrecen una protección que no es segura ni total y en ocasiones son difícilmente aplicables en las condiciones locales de cultivo: cultivo asociado a maíz, materiales indeterminados, humedad elevada, lluvias al final del cultivo y altas densidades de siembra. Además, la aplicación de fungicidas puede generar efectos no deseables en el medio y las plantas. En consecuencia, el desarrollo y utilización de cultivares resistentes es el método de lucha más eficaz contra esta enfermedad.

En judía se ha propuesto la existencia de hasta once genes diferentes de resistencia a antracnosis (denominados *Co-1* a *Co-11*; Kelly y Vallejo, 2004; Gonçalves-Vidigal *et al.*, 2005) aunque sólo siete de ellos se han caracterizado con más profundidad y se han localizado en el mapa genético de la especie: el gen *Co-1* en el grupo de ligamiento B1, *Co-2* en B11, *Co-3/Co-9* en B4, *Co-4* en B8 y *Co-5* y *Co-6* que se han localizado en el grupo de ligamiento B7. Hasta ahora, la idea más generalizada sobre la organización de estos genes suponía que se trataba de

genes únicos repartidos por el genoma, de tal forma que cada alelo confiere resistencia a un espectro más o menos amplio de razas fisiológicas del hongo. Sin embargo, trabajos más recientes (Rodríguez-Suárez *et al.* 2007a,b) aportan una nueva visión acerca de la herencia y organización de la resistencia genética en judía frente a este patógeno. Así, lo que se venía considerando como un locus con diferentes alelos (cada alelo con distintas especificidades de resistencia), estaría formado por loci estrechamente ligados formando un cluster, ofreciendo cada uno de ellos protección frente a una raza específica de antracnosis.

El tipo faba Granja Asturiana resulta altamente susceptible frente a algunas razas locales de antracnosis: razas 6 y 38 (Ferreira *et al.*, 2008). La introducción de genes de resistencia se presenta como la mejor solución para combatir este hongo de difícil control en los cultivos locales favoreciendo además, un cultivo más sostenible al evitarse los tratamientos fitosanitarios.



**Figura 3.2.** Síntomas de antracnosis producidos por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* sobre diferentes órganos de la planta en la especie *Phaseolus vulgaris* L.: **A.** Chancros oscuros y cóncavos sobre vaina. **B.** Necrosis sobre las venas principales irradiando hacia las secundarias en las hojas. **C.** Manchas oscuras sobre las semillas de faba Granja. **D.** Detalle de chancros en tallo en estado de plántula.

### Virus del mosaico común y necrótico de la judía

El virus del mosaico común (BCMV) y el virus necrótico del mosaico común (BCMNV), son los potyvirus más extendidos y destructivos para el cultivo de judía en todo el mundo (Drijfhout, 1978; Morales, 1983). Se transmiten con relativa facilidad entre plantas, ya sea mecánicamente o mediante insectos chupadores como los pulgones. Los síntomas de esta enfermedad (ver figura 3.3), se manifiestan sobre las hojas como manchas en mosaico verde claro/verde oscuro o en bandas perinerviales de color verde oscuro, arrugamientos del limbo foliar o enrollamiento de las hojas hacia abajo y deformaciones. Las plantas susceptibles se debilitan, dan poca flor y la cosecha se reduce tanto para vainas frescas como para semillas

disminuyendo el rendimiento del cultivo. El tipo faba Granja Asturiana resulta susceptible frente a ambos patógenos (ver figura 3.3B y 3.3C), aunque no muestra síntomas de necrosis sistémica (figura 3.3D). Sobre este material, los síntomas son particularmente evidentes al inicio del cultivo, en prefloración.

Se han descrito algunas estrategias agronómicas para minimizar los efectos de estos patógenos, como la utilización de semilla libre de potyvirus o el aislamiento de los cultivos (Hall y Nasser, 1996). Sin embargo, la facilidad con que se transmiten hace difícil su control. Por ello, el método más efectivo y duradero para el control de estos patógenos es el desarrollo y utilización de variedades resistentes (Drijfhout, 1978; Kelly *et al.*, 1995). En el caso de los potyvirus, la estrategia inicial fue la incorporación del alelo dominante del gen *I* (situado en el grupo de ligamiento B2), que parece impedir la replicación o el movimiento del virus dentro de la planta (Kelly *et al.*, 1995, 2003). Sin embargo, se pudo observar que ciertas cepas del virus necrótico en presencia de este gen producen una respuesta de hipersensibilidad dando como resultado una necrosis vascular y muerte de la planta. Los genes de resistencia recesivos *bc-1* y *bc-3* (situados en B3 y B6 respectivamente), combinados con el gen *I* o con el gen recesivo *bc-u* (situado en el grupo de ligamiento B3), proporcionan una protección más efectiva a largo plazo para estas enfermedades (Fraser, 1992; Johansen *et al.*, 2001). La independencia de estos genes de resistencia así como la descripción de marcadores moleculares ligados (Melotto *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997), facilitan el desarrollo de nuevas variedades portadoras de resistencia genética. En concreto, la combinación genética más utilizada para proteger los materiales es *I+bc-3* que confiere resistencia a todas las cepas descritas de BCMV y BCMNV (Drijfhout, 1978; Morales, 1983).



**Figura 3.3.** Sintomatología debida a la sensibilidad o resistencia al BCMV o BCMNV. **A.** Hoja trifoliada sin síntomas o resistente. **B.** Hoja trifoliada con mosaicos. **C.** Hoja trifoliada con arrugamientos. **D.** Planta con reacción de hipersensibilidad.

## Arquitectura o hábito de crecimiento de la planta

El tipo faba Granja presenta un hábito de crecimiento indeterminado trepador, por lo que el cultivo tradicional solía ser asociado a maíz. Este tipo de hábito de crecimiento, a pesar de ser más productivo, complica el manejo del cultivo porque necesita tutores, lo que implica una recolección manual y dificulta la aplicación de productos fitosanitarios. Todo ello repercute en el rendimiento final del cultivo.

En esta especie, las variantes para el hábito de crecimiento o porte de la planta se han clasificado en 4 tipos principales (véase Introducción general) que se pueden simplificar en dos grandes grupos: crecimiento determinado (tipo I) y crecimiento indeterminado (tipos II, III y IV). La herencia genética de los hábitos de crecimiento determinados frente a indeterminados está relativamente bien establecida. Se ha descrito que el gen *fin*, de herencia dominante y localizado en el grupo de ligamiento B1, controla los hábitos de crecimiento. Así, los genotipos recesivos dan lugar al hábito de crecimiento determinado y la expresión del carácter dominante da lugar al hábito indeterminado (Bassett, 2004).

## Programas de mejora genética desarrollados

Con objeto de minimizar los tres problemas anteriormente mencionados, a lo largo de la última década el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) junto con el Área de Genética de la Universidad de Oviedo, han desarrollado programas de mejora genética, para mejorar caracteres que incrementen la rentabilidad del cultivo de faba Granja en Asturias.

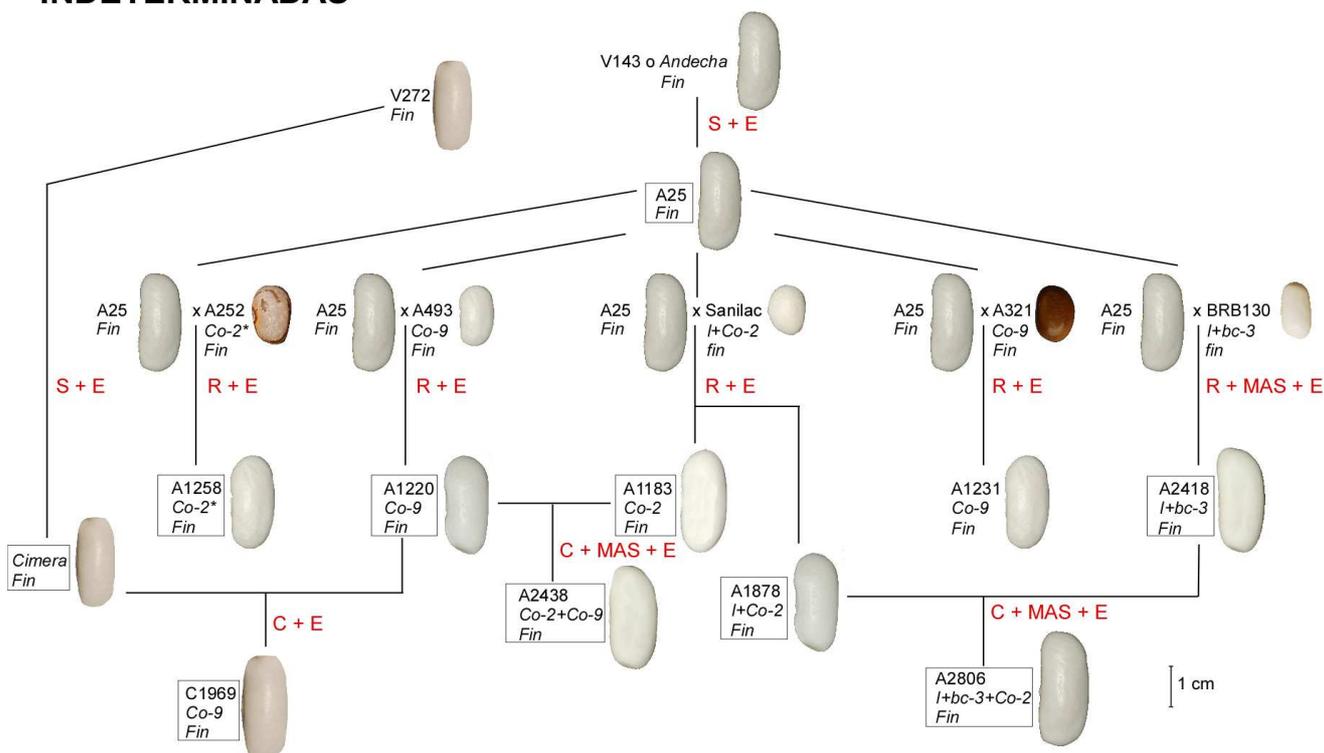
En todos los casos el objetivo perseguido era incorporar en la variedad comercial 'Andecha' (tipo faba Granja) nuevos alelos manteniendo las características esenciales de este tipo comercial. Por ello, las nuevas líneas desarrolladas son clasificadas como líneas esencialmente derivadas de la variedad 'Andecha'. Estas líneas están constituidas por materiales determinados e indeterminados en los que se han reunido los genes de resistencia: *Co-2* y *Co-9* frente a antracnosis y los genes *I* y *bc-3* que confieren resistencia frente al BCMV o BCMNV. La figura 3.4 resume el trabajo desarrollado y las líneas obtenidas. Las metodologías seguidas para la generación y aprovechamiento de la variación son diferentes según el caso:

- Selección individual dentro de entradas conservadas en la colección de semillas del SERIDA.
- Programas de retrocruzamiento.
- Programas genealógicos con selección individual a partir de cruzamientos sencillos.

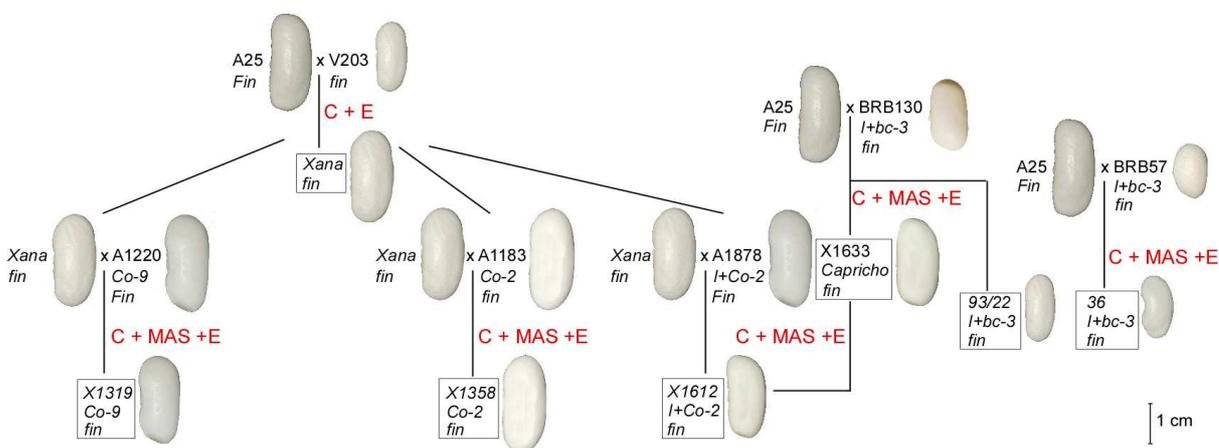
Por lo que respecta a la metodología seguida para la selección se ha utilizado:

- Selección asistida por marcadores moleculares ligados a los genes específicos manejados.
- Evaluación de la resistencia mediante inoculaciones con las razas o cepas locales.
- Evaluación fenotípica en campo atendiendo a caracteres morfológicos y resistencias.

### INDETERMINADAS



### DETERMINADAS



**Figura 3.4.** Esquemas mostrando la metodología seguida para la obtención de las líneas esencialmente derivadas de ‘Andecha’ con hábito de crecimiento indeterminado y determinado. En un recuadro aparecen los nombres de las líneas desarrolladas. Debajo del nombre de cada línea, se indican los genes que contienen en cuanto a la resistencia a antracnosis (*Co-2*, *Co-9*), BCMV y BCMNV (*I*, *bc-3*) y para el hábito de crecimiento determinado/indeterminado (*fin/Fin*). Se indica en rojo la metodología seguida para la obtención de cada línea, así como el procedimiento de selección: **C** = Cruzamiento sencillo, **R** = Retrocruzamiento, **S** = Selección individual, **MAS** = Selección asistida por marcadores, **E** = Evaluaciones de resistencia o de campo.

### **3.1.3 Objetivos**

Las líneas desarrolladas en el SERIDA mediante los programas de mejora genética poseen genes de resistencia y/o modificaciones de la arquitectura de la planta, manteniendo las características esenciales la variedad comercial 'Andecha' (tipo faba Granja). En total, se han obtenido 14 líneas (con fenotipo de semilla tipo Fabada) y 2 líneas con fenotipos diferentes (tipo White kidney y Canellini).

El objetivo de este apartado es evaluar estas líneas en las condiciones locales de cultivo, desde una perspectiva agronómica y de calidad, a fin de disponer de la máxima información antes de proceder a su posible liberación. En el caso de las líneas tipo Fabada, hay un objetivo adicional que consiste en compararlas con la variedad comercial 'Andecha'.

## 3.2 Material y métodos

### 3.2.1 Material vegetal

La tabla 3.1 describe el origen de cada una de las líneas estudiadas y la combinación genética incorporada así como sus principales características (véase también esquema de las líneas, figura 3.4). Todos los materiales de siembra utilizados en este trabajo derivan de multiplicaciones en invernadero bajo condiciones controladas, siguiendo un método genealógico con selección individual para preservar la identidad varietal y mantener las líneas. Todas ellas presentan un fenotipo de semilla dentro del tipo Fabada, excepto la línea 36, que es tipo comercial White kidney y la 93 del tipo comercial Canellini.

**Tabla 3.1.** Líneas obtenidas en el SERIDA incluidas en este trabajo. Se indica la clase comercial según Santalla *et al.* (2001), el origen, los genes y las nuevas características incorporadas respecto a la variedad comercial 'Andecha'. Determinado = Plantas con tallo y ramas terminados en inflorescencia. Indeterminado = Plantas con tallo no terminado en inflorescencia.

Material	Habito de crecimiento	Clase comercial	Origen	Características	Genes modificados
Andecha*	Indeterminado	Fabada	V143		
Cimera*	Indeterminado	Fabada	V272	Precocidad	
A1878*	Indeterminado	Fabada	A25 / Sanilac	Resistencia antracnosis + BCMV	I + Co-2
A2418*	Indeterminado	Fabada	A25 / BRB130	Resistencia a BCMV + BCMNV	I + bc-3
A1183*	Indeterminado	Fabada	A25 / Sanilac	Resistencia antracnosis	Co-2
A2438	Indeterminado	Fabada	A1220 x A1183	Resistencia antracnosis	Co-2 + Co-9
C1969	Indeterminado	Fabada	A1220 x Cimera	Resistencia antracnosis	Co-9
A1220*	Indeterminado	Fabada	A25 / A493	Resistencia antracnosis	Co-9
A1258	Indeterminado	Fabada	A25 / A252	Resistencia antracnosis	Co-2*
A2806*	Indeterminado	Fabada	A1878 x A2418	Resistencia a antracnosis, BCMV y BCMNV	I + Co-2+bc-3
Xana*	Determinado	Fabada	A25 x V203	Arquitectura tumbada	Fin
X1633*	Determinado	Fabada	A25 / BRB130	Arquitectura erecta	
X1612	Determinado	Fabada	Xana x A1878	Resistencia antracnosis	I + Co-2
X1358	Determinado	Fabada	Xana x A1183	Resistencia antracnosis + virosis	Co-2
X1319*	Determinado	Fabada	Xana x A1220	Resistencia antracnosis	Co-9
36*	Determinado	White kidney	A25 x BRB57	Resistencia a virosis	I + bc-3
93	Determinado	Canellini	A25 / BRB130	Resistencia antracnosis	I + bc-3

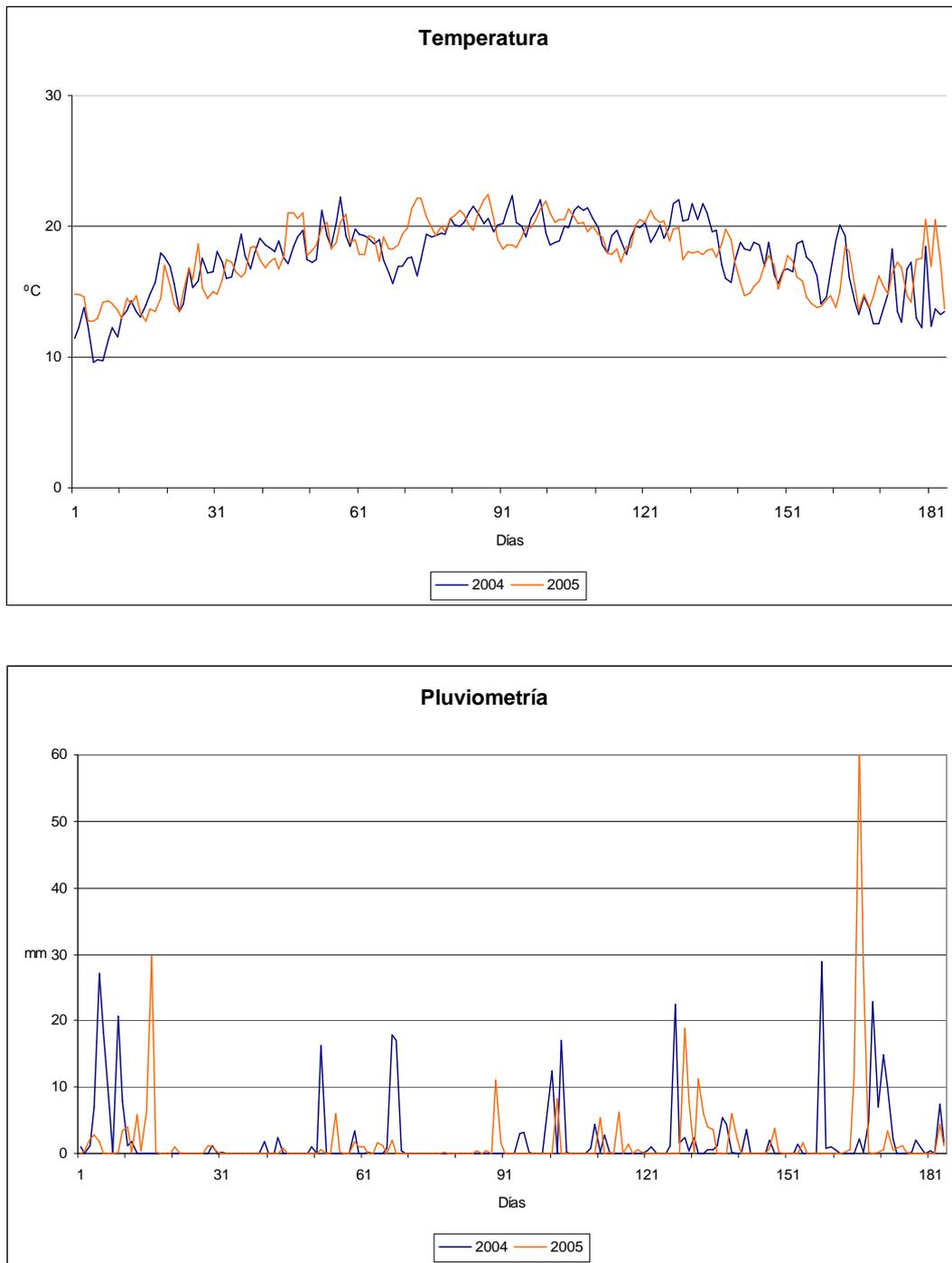
\* Variedades inscritas en la lista española de variedades comerciales y protegidas.

/ = Varios retrocruzamientos, x = cruzamiento sencillo.

### 3.2.2 Ensayos de campo

Los ensayos de evaluación se llevaron a cabo en parcelas del SERIDA situadas en Villaviciosa (Asturias) (43°29'01''N, 5°26'11''W, 6,5 msnm) durante los años 2004 y 2005 (figura 3.6A y 3.6B). Los datos climáticos para los meses en que se realizó el cultivo en campo pueden

encontrarse en la dirección <http://infomet.am.ub.es/infomet/clima/gijon/>. La temperatura y la pluviometría se muestran de forma detallada en la figura 3.5.



**Figura 3.5.** Registro de la temperatura y la pluviometría durante los meses de mayo a octubre en los dos años de cultivo. En el eje abcisas, 1 corresponde al 1 de mayo, 181 al 31 de octubre.

El cultivo se desarrolló sobre un suelo con textura franco-arcillosa siguiendo las recomendaciones de Fueyo (2004) en su manejo. Para las variedades indeterminadas, se emplearon tutores de varilla de hierro de 12 mm de diámetro y 2,5 m de longitud. Para obtener la

densidad de plantación buscada se realizó la siembra sobre cepellón de turba más trasplante. Las características de los ensayos se describen a continuación.

- **Año 2004:** 2 repeticiones distribuidas al azar por cada línea.

- *Materiales indeterminados:* cada parcela constaba de 3 líneas de cultivo de 3 m de largo. El marco de plantación fue: 1,2 x 0,20 m. La densidad inicial era alrededor de 3,9 plantas/m<sup>2</sup>.

- *Materiales determinados:* 5 filas de 2,5 m de largo. Marco de plantación: 0,5 x 0,20 m. La densidad inicial era alrededor de 9 plantas/m<sup>2</sup>.

La línea A2806 no se incluyó en los ensayos de campo llevados a cabo en el 2004.

- **Año 2005:** 3 repeticiones por cada línea en parcelas distribuidas al azar.

- *Materiales indeterminados:* idéntico al año anterior.

- *Materiales determinados:* 3 filas de 3 m de largo. Marco de plantación: 1 x 0,15 m, buscando una densidad de plantas similar a la del año anterior.



**Figura 3.6 A.** Cultivo en pleno desarrollo de las líneas objeto de estudio en 2005. En primer plano aparecen las líneas determinadas; al fondo, las líneas indeterminadas. **B.** Estado más avanzado de cultivo en 2004 con problemas en el control de las malas hierbas. Algunas variedades empiezan a secarse debido a su precocidad ('Cimera').

Los problemas observados durante el cultivo del primer año (ver figura 3.6B) en las variedades determinadas relacionados con el control de las malas hierbas, particularmente en las fases finales del cultivo, obligaron a variar el marco de plantación en 2005 de tal forma que la densidad de plantas por metro cuadrado no se modificó con respecto al 2004. Para facilitar las labores de limpieza de malas hierbas en 2005, se amplió el marco de plantación lo que permitió realizar pases de motocultor entre calles y mejorar así, el desarrollo general del cultivo.

### 3.2.3 Caracteres analizados

Con objeto de disponer de una amplia información acerca del comportamiento del material, las variedades incluidas en esta evaluación fueron sometidas a una caracterización morfológica, fenológica, agronómica y de calidad. Para realizar estas evaluaciones, las semillas cosechadas se secaron en invernadero hasta que alcanzaron una humedad del 12-15%. Posteriormente, permanecieron en cámara a -20 °C durante 48 horas para evitar problemas de gorgojo (Fueyo, 2004). Para su conservación las semillas se guardan en botes de cristal herméticos en una cámara de refrigeración con una temperatura de 4° C y humedad relativa del 30-35%.

#### Caracteres morfológicos

El material fue sometido a una caracterización morfológica utilizando la lista de descriptores cualitativos comúnmente aplicados en el SERIDA para la caracterización de germoplasma de judía (Ferreira *et al.*, 2005) y que se describen en la tabla 2.1 del apartado 2 de esta memoria. Para completar esta caracterización, se consideraron las siguientes clases en el hábito de crecimiento que se observan en la figura 3.7.

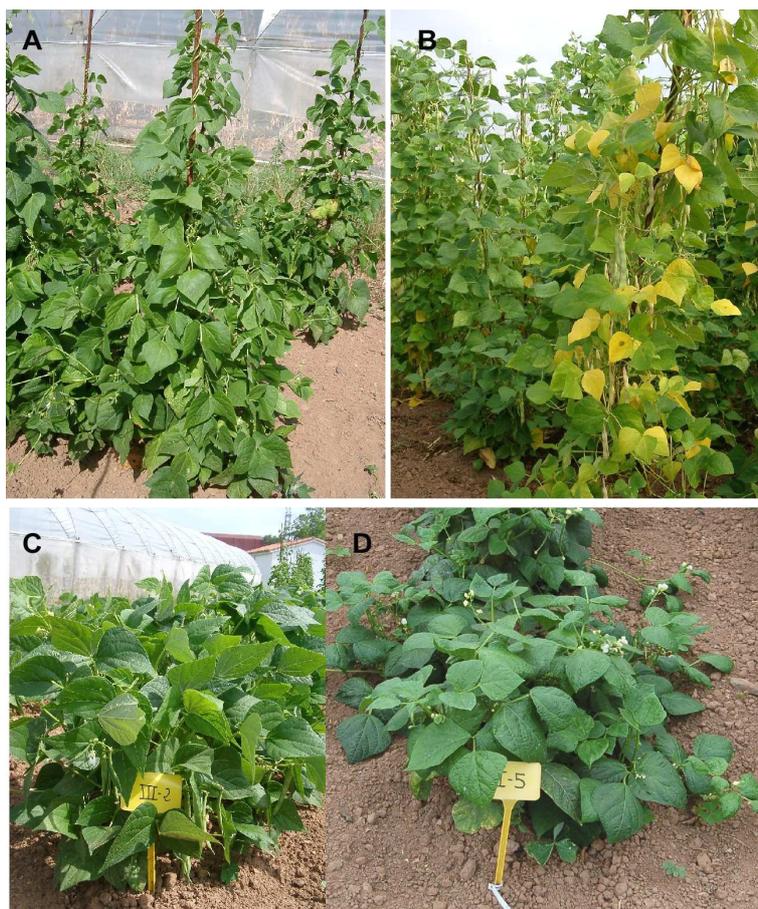
- *Hábito de crecimiento* (Singh, 1982; Debouck e Hidalgo, 1985):

Indeterminado tipo IVa: Plantas trepadoras con entrenudos cortos, predominante ramificación basal y vainas distribuidas a lo largo de toda la planta.

Indeterminado tipo IVb: Plantas trepadoras con entrenudos largos y una distribución de las vainas localizadas preferentemente en la parte alta de la planta.

Determinado tipo Ia: Plantas con entrenudos cortos, nula aptitud para trepar y sin tendencia al encamado en las fases finales del cultivo.

Determinado tipo Ib: Plantas con entrenudos largos, cierta capacidad de torsión del tallo, cierta aptitud para trepar y elevada tendencia al encamado a partir de la floración.



**Figura 3.7.** Hábito de crecimiento indeterminado tipo IV y determinado tipo I. **A.** Hábito de crecimiento IVa con predominante ramificación basal. **B.** Hábito de crecimiento IVb, distribución de vainas a lo largo de la planta. **C.** Hábito de crecimiento Ia, las plantas se mantienen erectas. **D.** Hábito de crecimiento Ib, las plantas presentan cierta tendencia al encamado.

Además, se midieron seis caracteres cuantitativos relacionados con las dimensiones de la semilla y de la vaina, la clase comercial según Santalla *et al.* (2001) y se controló en campo la presencia de síntomas para antracnosis y virus.

- *Longitud de la vaina* (cm). Longitud media de 10 vainas extendidas en estado de verdeo tomadas al azar.

- *Ancho de la vaina* (mm). Anchura media a la altura de la segunda semilla desde el punto de inserción de la vaina, de 10 vainas extendidas en estado de verdeo tomadas al azar. Se mide perpendicularmente a la longitud.

- *Grueso de la vaina* (mm). Media del grosor de 10 vainas en estado de verdeo tomadas al azar. Se mide a la altura de la segunda semilla desde el punto de inserción. Se toma transversalmente a la longitud.

- *Longitud de la semilla* (mm). Longitud media de 20 semillas tomadas al azar de cada muestra.
- *Ancho de la semilla* (mm). Anchura media de 20 semillas tomadas al azar de cada muestra, se mide perpendicularmente al hilum.
- *Grueso de la semilla* (mm). Grosor medio de 20 semillas tomadas al azar de cada muestra y medido transversalmente al hilum.

Finalmente, en esta caracterización se consideraron los siguientes caracteres:

- *Clase comercial*, según Santalla *et al.* (2001).
- Se controló en campo la *presencia de síntomas de antracnosis y/o virosis*.

### **Caracteres fenológicos**

En este apartado los caracteres considerados fueron (según Debouck e Hidalgo, 1985):

- *Días al inicio de floración* (días): días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas de la parcela presentan la primera flor abierta.
- *Días al final de floración* (días): días transcurridos desde la siembra hasta que la mayor parte de las plantas carecen de flores abiertas.
- *Días a la cosecha de verdeo* (días): días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas desarrolladas tienen las vainas en su estado óptimo para su consumo en verde (vaina totalmente desarrollada en su longitud y semillas iniciando su engrosamiento).
- *Días a la recolección* (días): días transcurridos desde la siembra hasta que las vainas están secas, la humedad de la semilla entorno al 15% y alcanzan su coloración típica.

### **Caracteres de interés agronómico**

En este apartado los caracteres considerados fueron:

- *Peso de 100 semillas* (g): se estima a partir de 2 lotes de 100 semillas tomadas al azar de las semillas limpias producidas en cada parcela.
- *Número medio de semillas/vaina*: se estima a partir del número de semillas en 25 vainas secas tomadas al azar del material cosechado.

- *Número de vainas producidas* (vainas/m<sup>2</sup>): se analizó el número total de vainas producidas por parcela y se dividió entre el número de m<sup>2</sup>.
- *Producción bruta* (g/m<sup>2</sup>): se considera producción bruta, la producción de semillas con valor comercial y el destrío.
- *Peso del destrío o semilla deteriorada* (g/m<sup>2</sup>): se consideran semillas deterioradas aquellas sin valor comercial: rotas, pequeñas, deformes, con podredumbres, etc. (ver figura 3.8).
- *Composición del destrío*. Las semillas consideradas como destrío se clasificaron en 5 clases principales: con podredumbres; pequeñas; arrugadas, deformes o abiertas; manchadas y otros. El análisis se realiza a partir de dos lotes de 100 semillas tomadas al azar de cada muestra.



**Figura 3.8.** Distintos tipos considerados en la composición de la semilla deteriorada: semillas con podredumbres, pequeñas, deformes, arrugadas o abiertas, manchadas y otros.

Para los caracteres relacionados con la producción: número de vainas/m<sup>2</sup>, producción bruta (g/m<sup>2</sup>) y peso del destrío (g/m<sup>2</sup>) se consideraron sólo aquellas parcelas cuya densidad final (plantas/m<sup>2</sup>) difería en menos de un 10% de la densidad inicial.

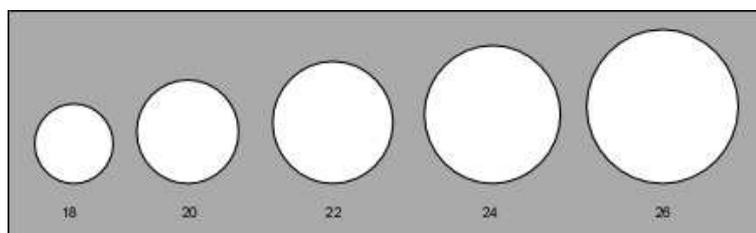
### **Caracteres vinculados a la calidad**

Se consideraron varios caracteres de interés relacionados con la calidad como el rendimiento en calibres comerciales o el comportamiento en el remojo y tras la cocción. La metodología seguida para evaluar el comportamiento tras el remojo, la proporción de piel y el comportamiento en cocción, fue adaptada de Guzmán-Maldonado *et al.* (1995).

- *Rendimiento en calibre de la semilla* (%). Dentro de la semilla con valor comercial se toman dos muestras aleatorias de 100 semillas. Cada semilla se pasa por los diferentes orificios del calibre de menor a mayor diámetro, asignándose cada semilla a la clase en la que primero entra longitudinalmente. Los diámetros considerados de los orificios fueron: 18, 20, 22, 24, 26 y > 26 mm (ver figura 3.9). Atendiendo al calibre longitudinal de las semillas, se evalúa el rendimiento en semilla de diferentes categorías en cada una de las variedades, considerando:

- *Categoría extra*, si la longitud de las semillas es mayor de 22 mm (pasa por los orificios de 24 y 26 mm).

- *Categoría primera* si está entre 20 mm y 22 mm (orificios de 20 y 22 mm).
- *Categoría pequeña* menor de 20 mm (orificio de 18 mm).



**Figura 3.9.** Regleta con orificios de diferentes diámetros utilizada para estimar las proporciones de las distintas categorías de un lote de semillas. Diámetros de los orificios en mm.

- *Capacidad de absorción de agua (%)*. Se toman al azar 3 muestras de 25 semillas por cada repetición y se ponen a remojo en agua destilada a temperatura ambiente. Se determina el peso de las 25 semillas antes y después del remojo, transcurridas 4 horas y 16 horas. La capacidad de absorción a las 4 y 16 horas de remojo se cuantifica mediante la siguiente fórmula (Bressani *et al.*, 1988; Guzmán-Maldonado *et al.*, 1995).

$$\text{Capacidad de absorción} = \frac{(\text{Peso en remojo (g)} - \text{Peso seco (g)})}{\text{Peso seco (g)}} \times 100$$

Donde:

*Peso en remojo (g)*: Peso medio de 25 semillas tras remojo en agua destilada durante 4 y 16 horas.

*Peso seco (g)*: Peso medio de 25 semillas antes de iniciar la hidratación.

- *Proporción de piel de las semillas (%)*. Se toman al azar 4 lotes de 5 semillas por cada muestra y se ponen a remojo en agua destilada a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separa el tegumento del albumen con ayuda de un bisturí y se someten a secado forzoso en estufa a 80 °C durante 8 días. Transcurrido ese periodo de secado, se pesa el tegumento y el albumen. La proporción de piel se estima aplicando la siguiente fórmula (Elías *et al.*, 1986):

$$\text{Proporción de piel} = \frac{\text{Peso tegumento (g)}}{\text{Peso tegumento (g)} + \text{Peso albumen (g)}} \times 100$$

- *Integridad tras la cocción* (% semillas enteras). Se toman al azar 2 muestras de 25 semillas de cada repetición y se ponen a remojo en agua destilada durante 16 horas a temperatura ambiente. Se introducen las muestras en unos vasos de precipitados con 250 ml de agua destilada y estos a su vez en un vaso de precipitados, con capacidad para 5000 ml con 1000 ml de agua destilada durante 35 minutos contados desde que la temperatura alcanza los 90 °C (tiempo estándar de cocción de 'Andecha' antes de que la semilla comience a deteriorarse significativamente). Una vez transcurrido este tiempo, se sacan los vasos y se vierte su contenido en una placa petri. La integridad se evalúa contando el número de semillas enteras.

- *Tiempo óptimo de cocción* (s): para estimar el tiempo de cocción óptimo de las líneas estudiadas se utilizó un cocedor Mattson que se muestra en la figura 3.10, adaptado en el SERIDA a partir del descrito por Jackson y Varriano-Marston, (1981). Se analizan 3 lotes de 20 semillas de cada muestra previamente hidratadas en 250 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se colocan las semillas en el cocedor Mattson y se introduce el equipo en un vaso de precipitados, con capacidad para 5000 ml, que contiene 3000 ml de agua destilada en ebullición. Se anota el tiempo que tarda en atravesar una varilla la primera semilla, tiempo de la undécima y tiempo que tardará la última varilla, considerando las semillas atravesadas como cocidas. El tiempo medio de cocción en segundos, se define como el tiempo necesario para que 11 varillas (el 50%) atraviesen otras tantas semillas. El intervalo de tiempo de cada variedad es la diferencia de tiempo entre la primera y la última. Este valor ofrece una estimación de la heterogeneidad de la muestra para este carácter.

En todos los caracteres relacionados con el comportamiento en cocción se utiliza un hornillo eléctrico con un potencia de 2000 W.



**Figura 3.10.** Cocedor tipo Mattson, adaptado en el SERIDA a partir del descrito por Jackson y Varriano-Marston (1981).

### **3.2.4 Análisis estadístico**

Se analizaron las posibles diferencias significativas entre los materiales evaluados con fenotipo de semilla Fabada, con respecto a la variedad testigo 'Andecha'. Para ello se aplicó un análisis de varianza seguido de una comparación de medias usando el *test de Duncan* con un nivel de significación  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados con la ayuda del programa informático SPSS v.12.

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Caracteres morfológicos

Las líneas fueron sometidas a una caracterización morfológica completa de acuerdo con la lista de descriptores habitualmente utilizados en el SERIDA (Ferreira *et al.*, 2005). Para la mayor parte de los descriptores analizados no se encontraron evidencias de diferencias frente al testigo 'Andecha'. La tabla 3.2 reúne los resultados de la caracterización morfológica realizada para un juego de caracteres considerados de mayor interés. En el carácter hábito de crecimiento o arquitectura de la planta no sólo se han identificado diferencias a nivel de crecimiento determinado e indeterminado. Así, dentro de los materiales determinados, las líneas 'Xana', X1612, X1358 y X1319 mostraron hábito Ib. Por el contrario, la línea X1633 presentó hábito Ia (plantas erectas). Dentro de los materiales indeterminados A1878, A2418, A1183, A1220, y A2806 presentaron hábito IVb. En cambio, 'Cimera', A2438 y A1258 mostraron hábito de crecimiento IVa con predominante ramificación basal.

Por lo que respecta a los caracteres de semilla, todas las líneas mostraron un fenotipo o morfología de semilla oblonga muy grande, dentro del tipo comercial Fabada (véase más adelante, figura 3.11). Sin embargo, se encuentran ciertas diferencias en cuanto a tamaño, llenado de las semillas o forma más o menos arriñonada. Así, líneas determinadas como X1612, X1358 y X1319 suelen presentar una semilla con un arriñonamiento más acentuado.

**Tabla 3.2.** Resultado de la caracterización morfológica para hábito de crecimiento, morfología de la semilla y presencia de síntomas de virosis y antracnosis. El hábito de crecimiento se ha clasificado de acuerdo con Singh (1982) y Debouck e Hidalgo (1985).

Material	Habito de crecimiento		Morfología de la semilla				Síntomas	
			Forma transversal	Forma longitudinal	Color	Brillo	BCMV-BCMNV	Antracnosis
Andecha	Indeterminado	IVb	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
Cimera	Indeterminado	IVa	Llena	Oblonga	Blanco	Mate	Si	No
A1878	Indeterminado	IVb	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	No	No
A2418	Indeterminado	IVb	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	No	No
A1183	Indeterminado	IVb	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
A2438	Indeterminado	IVa	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
C1969	Indeterminado	IVb	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
A1220	Indeterminado	IVb	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
A1258	Indeterminado	Iva	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
A2806	Indeterminado	IVb	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	No	No
Xana	Determinado	Ib	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	Si
X1633	Determinado	Ia	Llena	Oblonga	Blanco	Brillo	Si	Si
X1612	Determinado	Ib	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	No	No
X1358	Determinado	Ib	Llena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
X1319	Determinado	Ib	Semillena	Oblonga	Blanco	Medio	Si	No
36	Determinado	Ia	Llena	Arriñonada	Blanco	Brillo	No	No
93	Determinado	Ib	Semillena	Oblonga	Blanco	Brillo	No	Si

Por lo que respecta a la resistencia frente a virosis (BCMV o BCMNV) y antracnosis cabe señalar que las condiciones de cultivo fueron muy favorables para virosis y poco favorables para el desarrollo del hongo. Se identificaron síntomas característicos de virosis (mosaicos y abultamientos en las hojas, retraso del desarrollo) en todas las líneas excepto en las líneas A1878, A2418, A2806, X1612. En ningún material se identificaron síntomas de necrosis sistémica, respuesta de determinados genotipos frente a ciertas cepas de BCMNV (Morales, 1983). Sin embargo, la presencia de este tipo de cepas fue constatada sobre otras variedades en la finca de Villaviciosa en las mismas campañas. Para la antracnosis los resultados fueron menos concluyentes, debido a la escasa presencia de la enfermedad en los dos años de cultivo, no se identificaron sus síntomas en variedades susceptibles.

En cuanto a los caracteres cuantitativos medidos en este apartado, la tabla 3.3 muestra los valores medios para las dimensiones de la vaina y la semilla en cada material evaluado. Los resultados mostraron que las variedades determinadas disponen de una longitud de vaina significativamente inferior a la de los materiales indeterminados.

**Tabla 3.3.** Valores medios, error asociado a la media y número de medidas (N) de las dimensiones de las vainas y las semillas. Valores obtenidos en el ensayo desarrollado en Villaviciosa (Asturias) en las campañas 2004 y 2005. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	Dimensiones de la vaina						Dimensiones de la semilla						
		Longitud (cm)		Ancho (mm)		Grueso (mm)		Longitud (mm)		Ancho (mm)		Grueso (mm)		
		Media	Error	Media	Error	Media	Error	N	Media	Error	Media	Error	Media	Error
Andecha	50	15,1 ± 0,2	cd	13,7 ± 0,2	cd	7,5 ± 0,1	abc	100	23,0 ± 0,1	hfg	9,9 ± 0,0	f	7,4 ± 0,1	bc
Cimera	50	14,9 ± 0,2	bc	13,0 ± 0,1	ab	7,5 ± 0,1	abc	100	21,9 ± 0,1	bc	9,3 ± 0,0	ab	7,1 ± 0,0	a
A1878	50	15,0 ± 0,2	cd	12,8 ± 0,4	bcd	8,5 ± 0,2	ef	100	22,8 ± 0,1	fgh	9,8 ± 0,0	ef	7,8 ± 0,1	ef
A2418	50	15,6 ± 0,2	d	13,6 ± 0,2	cd	7,2 ± 0,2	a	100	21,6 ± 0,1	b	9,5 ± 0,0	c	7,7 ± 0,0	def
A1183	50	15,6 ± 0,2	d	13,7 ± 0,2	cd	7,3 ± 0,2	ab	100	23,6 ± 0,1	i	10,0 ± 0,0	g	7,7 ± 0,1	def
A2438	50	15,0 ± 0,2	cd	13,4 ± 0,2	bc	7,2 ± 0,1	a	100	23,6 ± 0,1	i	10,0 ± 0,0	g	7,7 ± 0,1	def
C1969	50	14,8 ± 0,2	bc	13,4 ± 0,2	bc	7,0 ± 0,1	a	100	23,1 ± 0,1	gh	9,9 ± 0,0	ef	7,3 ± 0,0	b
A1220	50	14,5 ± 0,2	bc	13,5 ± 0,2	bc	7,4 ± 0,1	abc	100	23,2 ± 0,1	h	9,9 ± 0,0	fg	7,7 ± 0,0	def
A1258	50	14,4 ± 0,2	cd	13,2 ± 0,2	abc	7,0 ± 0,1	a	100	22,0 ± 0,1	cd	9,6 ± 0,0	d	7,1 ± 0,1	a
A2806	30	16,3 ± 0,3	e	14,7 ± 0,1	f	8,9 ± 0,2	f	60	22,7 ± 0,1	fg	9,7 ± 0,1	de	7,8 ± 0,1	ef
Xana	50	13,6 ± 0,2	a	13,2 ± 0,2	abc	7,4 ± 0,2	abc	100	23,1 ± 0,1	gh	9,6 ± 0,0	d	7,6 ± 0,1	cde
X1633	50	13,3 ± 0,2	a	14,1 ± 0,2	de	7,9 ± 0,2	bcd	100	20,8 ± 0,1	a	9,2 ± 0,0	a	7,7 ± 0,0	def
X1612	50	13,1 ± 0,2	a	14,3 ± 0,2	e	7,9 ± 0,2	cd	100	22,3 ± 0,1	de	9,8 ± 0,0	ef	7,6 ± 0,0	de
X1358	50	13,6 ± 0,2	a	13,7 ± 0,2	cd	8,3 ± 0,2	def	100	22,7 ± 0,1	fg	9,4 ± 0,0	bc	7,5 ± 0,1	cd
X1319	50	13,7 ± 0,2	a	13,5 ± 0,2	bc	8,1 ± 0,2	de	100	22,5 ± 0,1	ef	9,2 ± 0,0	a	7,5 ± 0,1	bc
36	50	12,6 ± 0,2		12,7 ± 0,1		8,2 ± 0,2		100	16,2 ± 0,1		7,7 ± 0,0		7,3 ± 0,0	
93	50	11,7 ± 0,1		12,6 ± 0,1		9,0 ± 0,1		100	20,0 ± 0,1		8,6 ± 0,1		6,6 ± 0,0	



**Figura 3.11.** Semillas de cada una de las líneas desarrolladas en el SERIDA cosechadas en la campaña del 2005.

### 3.3.2 Caracteres relacionados con la fenología

La tabla 3.4 refleja los valores medios obtenidos para los dos años en cuanto a caracteres fenológicos considerados: inicio de floración, verdeo, final de floración y recolección.

**Tabla 3.4.** Valores medios, error asociado a la media y número de medidas (N) de los caracteres fenológicos considerados. Valores obtenidos en el ensayo desarrollado en Villaviciosa (Asturias) en las campañas 2004 y 2005. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	Inicio floración (días)		Verdeo (días)		Final floración (días)		Recolección (días)					
		Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error				
Andecha	5	73,0	± 0,0	gh	82,5	± 1,2	b	103,7	± 1,4	cd	140,0	± 1,8	c
Cimera	5	67,3	± 0,7	de	86,0	± 0,6	cd	95,2	± 0,4	bc	124,3	± 0,4	b
A1878	5	64,0	± 2,1	cd	82,8	± 0,5	bc	94,6	± 0,2	b	127,8	± 1,7	b
A2418	5	61,4	± 1,0	c	82,0	± 0,9	b	94,6	± 0,2	b	121,8	± 2,0	b
A1183	5	73,8	± 0,8	gh	87,6	± 1,5	de	106,2	± 0,7	d	152,0	± 5,3	d
A2438	5	75,4	± 1,0	h	90,0	± 0,0	e	103,8	± 1,7	cd	143,8	± 1,6	c
C1969	5	68,8	± 0,5	ef	85,8	± 0,7	cd	103,8	± 1,7	cd	137,0	± 2,9	c
A1220	5	72,4	± 0,6	fgh	87,6	± 1,5	de	103,8	± 1,7	cd	141,0	± 2,4	c
A1258	5	70,6	± 0,6	efg	87,6	± 1,5	de	105,0	± 1,2	d	139,8	± 3,0	c
A2806	3	63,0	± 0,0	c	80,0	± 0,0	b	95,0	± 0,0	bc	125,0	± 0,0	b
Xana	5	53,0	± 2,6	ab	71,8	± 0,7	a	80,2	± 3,9	a	112,2	± 2,0	a
X1633	5	54,4	± 1,7	b	70,9	± 0,9	a	80,4	± 4,0	a	105,6	± 1,2	a
X1612	5	49,6	± 1,5	a	71,8	± 0,7	a	81,8	± 2,9	a	112,2	± 2,0	a
X1358	5	52,4	± 1,9	ab	72,6	± 1,3	a	80,4	± 4,8	a	109,4	± 2,2	a
X1319	5	51,0	± 0,8	ab	71,4	± 1,9	a	80,4	± 5,6	a	109,4	± 2,2	a
36	5	45,8	± 0,5		70,6	± 1,5		77,0	± 4,9		103,0	± 0,0	
93	5	52,0	± 0,0		72,2	± 2,2		80,4	± 4,6		108,6	± 3,4	

En general, se observó una mayor precocidad en el ciclo de cultivo de las líneas determinadas frente a las indeterminadas en todos los estados fenológicos considerados. Las líneas determinadas se cosecharon alrededor de los 110 días mientras que las indeterminadas se recolectaron en torno a los 135 días. Además, las líneas A1878, A2418 y A2806, portadoras de resistencia a potyvirus junto con la variedad 'Cimera', resultaron ser más precoces que la variedad testigo 'Andecha'. Por el contrario la línea A1183 se cosechó significativamente más tarde que 'Andecha'.

### 3.3.3 Caracteres de interés agronómico

La tabla 3.5 muestra los valores medios obtenidos para caracteres íntimamente relacionados con la producción y el rendimiento, como son: el peso medio de 100 semillas, el número de semillas/vaina, el número de vainas/m<sup>2</sup>, la producción bruta y el peso del destrío.

El peso medio de 100 semillas varió dentro de los márgenes típicos que definen el tipo comercial Fabada, en torno a los 100 g o superior. Este carácter osciló entre 116,2 g (A1183) y 91,7 g ('Cimera'). Los valores menores los presentaron la variedad 'Cimera', A2418, X1633 y X1319, que aunque fueron significativamente inferiores al testigo 'Andecha', pueden considerarse dentro del tipo Fabada. Por el contrario, los valores significativamente mayores los presentaron las líneas A1220, A2438 y A1183.

Los valores medios del número medio de semillas/vaina oscilaron entre 3,3 semillas de la línea determinada X1633 y 4,5 semillas de la línea A2806.

Los caracteres de producción como el número de vainas/m<sup>2</sup>, oscilaron entre 102 de la línea A2438 y 76 vainas/m<sup>2</sup> de X1633. Por su parte, las producciones variaron entre 125,5 g/m<sup>2</sup> de la línea X1633 y 333,7 g/m<sup>2</sup> de la línea indeterminada A2418. Se observa que las líneas indeterminadas presentan una producción de vainas ligeramente superior (91,5 frente a 84,1 vainas/m<sup>2</sup>) y una mayor producción de semilla comercial (208 frente a 112 g/m<sup>2</sup>) que las líneas determinadas, aunque estas diferencias no siempre resultaron significativas desde el punto de vista estadístico. Dentro de las líneas indeterminadas destaca A2806, con una producción bruta superior a la del testigo 'Andecha'.

Los valores medios del peso del destrío, oscilaron entre 32,4 g/m<sup>2</sup> de X1633 y 71,4 g/m<sup>2</sup> de la línea A2806. Generalmente, los materiales con crecimiento determinado mostraron una mayor proporción de semillas deterioradas; 32% del total de la producción frente al 20% de los indeterminados. Además, un análisis pormenorizado del tipo de destrío muestra que, en términos generales, las líneas determinadas presentan una mayor proporción de semillas con podredumbres o arrugadas que las indeterminadas. En todo caso, la proporción de destrío es un parámetro altamente variable entre campañas dada su enorme influencia ambiental, obteniéndose para una misma línea valores que presentaron un amplio rango de variación entre un año y otro.

**Tabla 3.5.** Valores medios, error asociado a la media, número de medidas (N) y resultados de la comparación de medias del peso de 100 semillas, nº semillas/vaina, nº vainas/m<sup>2</sup>, producción bruta y producción de destrío en los ensayos llevados a cabo en las instalaciones del SERIDA – Villaviciosa en las campañas 2004 y 2005. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	Peso 100 semillas (g)		Nº semillas / vaina		Nº vainas/m <sup>2</sup>		Producción bruta (g/m <sup>2</sup> )		Producción de destrío (g/m <sup>2</sup> )		
		Media	Error	N	Media	Error	Media	Error	Media	Error		
Andecha	10	109,3 ± 0,4	h	5	3,9 ± 0,1	bcd	82,1 ± 8,3	a	209,2 ± 33,0	abcde	38,2 ± 2,8	ab
Cimera	10	91,7 ± 0,7	a	5	4,3 ± 0,1	e	87,6 ± 4,0	a	212,5 ± 10,4	abcde	58,2 ± 5,0	abc
A1878	10	105,6 ± 0,9	efg	5	4,3 ± 0,1	e	83,9 ± 5,9	a	263,7 ± 43,3	bcde	60,3 ± 4,0	abc
A2418	10	98,6 ± 0,9	b	5	4,3 ± 0,1	e	99,6 ± 6,0	a	333,7 ± 57,1	e	63,9 ± 3,5	abc
A1183	10	116,2 ± 1,0	i	5	4,2 ± 0,1	de	94,9 ± 8,2	a	296,9 ± 52,4	de	46,6 ± 6,3	abc
A2438	10	115,6 ± 0,8	i	5	3,9 ± 0,1	cd	101,9 ± 9,4	a	289,6 ± 62,8	cde	41,8 ± 6,3	abc
C1969	10	107,0 ± 0,4	fgh	5	4,2 ± 0,1	de	89,2 ± 8,8	a	288,5 ± 62,0	cde	42,1 ± 7,6	abc
A1220	10	115,3 ± 0,8	i	5	3,7 ± 0,1	bc	84,8 ± 11,9	a	201,2 ± 42,9	abcd	34,0 ± 4,6	a
A1258	10	104,6 ± 0,9	ef	5	4,2 ± 0,1	de	90,5 ± 9,0	a	237,2 ± 31,3	abcde	38,2 ± 8,1	ab
A2806	6	107,5 ± 0,5	gh	3	4,5 ± 0,1	e	100,6 ± 3,1	a	241,3 ± 22,2	abcde	71,4 ± 5,6	c
Xana	10	103,5 ± 0,5	de	5	3,5 ± 0,1	bc	91,9 ± 5,9	a	204,6 ± 21,5	abcd	52,7 ± 8,2	abc
X1633	10	92,0 ± 0,8	a	5	3,3 ± 0,1	a	76,4 ± 6,6	a	125,5 ± 10,7	a	32,4 ± 2,8	a
X1612	10	101,7 ± 1,0	bc	5	3,5 ± 0,1	bc	95,9 ± 6,8	a	166,3 ± 17,1	abc	48,3 ± 15,5	abc
X1358	10	100,7 ± 0,9	cd	5	3,6 ± 0,1	abc	78,9 ± 7,9	a	177,2 ± 32,1	abcd	59,9 ± 19,8	abc
X1319	10	98,3 ± 1,2	b	5	3,7 ± 0,1	abc	77,5 ± 8,5	a	146,2 ± 25,0	ab	67,5 ± 20,1	bc
36	10	62,3 ± 0,5		5	3,9 ± 0,1		118,3 ± 8,1		173,8 ± 19,5		48,2 ± 14,9	
93	10	79,4 ± 0,8		5	3,1 ± 0,1		120,1 ± 8,3		168,2 ± 14,4		47,9 ± 12,2	

Un análisis pormenorizado del tipo de destrío se muestra en la tabla 3.6. Las semillas consideradas como deterioradas se agrupan en 5 clases principales: con podredumbres; pequeñas; arrugadas, deformes o abiertas; manchadas y otras. Los resultados obtenidos no muestran una clara diferencia en la composición del destrío, entre las variedades determinadas e indeterminadas. Sin embargo, en la tabla 3.6, se observan unos valores muy altos en los errores de los valores medios en la composición del destrío ya que los resultados obtenidos variaron en los dos ciclos de cultivo.

**Tabla 3.6.** Análisis de la composición media del destrío. Se indican los valores medios obtenidos en cada clase, errores asociados a las medias, número de medidas (N) y los resultados de la comparación de medias. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	% con podredumbres		% pequeñas		% arrugadas y/o abiertas		% manchadas		% otros						
		Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error					
Andecha	10	8,8	± 1,1	a	7,6	± 1,6	bcd	54,9	± 3,5	a	25,6	± 2,9	ab	3,1	± 2,2	a
Cimera	10	10,1	± 2,0	a	7,3	± 1,2	bcd	52,5	± 7,1	a	25,4	± 5,5	ab	4,8	± 1,2	a
A1878	10	14,5	± 0,4	a	9,6	± 2,1	d	52,6	± 5,7	a	22,9	± 4,1	ab	0,4	± 0,2	a
A2418	10	13,4	± 2,0	a	9,1	± 2,8	cd	42,9	± 9,6	a	31,3	± 7,8	ab	3,3	± 2,2	a
A1183	10	6,3	± 1,1	a	4,9	± 1,3	abcd	45,1	± 7,2	a	38,8	± 9,2	b	4,9	± 3,1	a
A2438	10	6,6	± 1,6	a	9,4	± 3,1	d	52,7	± 4,2	a	29,9	± 6,3	ab	1,4	± 0,6	a
C1969	10	6,4	± 1,7	a	4,3	± 0,8	abc	60,9	± 2,9	a	27,7	± 1,8	ab	0,7	± 0,4	a
A1220	10	7,6	± 1,1	a	4,1	± 1,2	abc	45,3	± 8,8	a	42,4	± 10,2	b	0,6	± 0,4	a
A1258	10	6,1	± 1,7	a	6,1	± 0,9	abcd	49,8	± 6,0	a	36,9	± 6,3	b	1,1	± 0,6	a
A2806	6	9,0	± 3,2	a	4,3	± 1,0	abc	70,3	± 0,4	a	16,0	± 2,3	a	0,5	± 0,3	a
Xana	10	15,9	± 6,4	a	3,0	± 1,2	ab	46,8	± 12,0	a	30,0	± 6,6	ab	4,3	± 2,2	a
X1633	10	12,4	± 4,0	a	1,9	± 0,8	a	48,2	± 9,5	a	34,7	± 6,4	ab	2,9	± 1,4	a
X1612	10	17,9	± 7,3	a	2,8	± 1,3	ab	48,2	± 12,9	a	27,3	± 5,5	ab	3,8	± 1,5	a
X1358	10	18,6	± 8,7	a	1,5	± 0,5	a	43,3	± 12,1	a	31,7	± 6,2	ab	4,9	± 2,2	a
X1319	10	16,7	± 8,8	a	1,6	± 0,9	a	52,9	± 10,2	a	22,2	± 2,6	ab	6,6	± 3,9	a
36	10	15,5	± 8,6		4,1	± 0,4		24,5	± 9,0		37,0	± 7,0		18,9	± 9,3	
93	10	16,1	± 7,5		4,4	± 1,4		35,7	± 10,8		37,7	± 5,7		6,1	± 3,2	

En general, las variedades determinadas se caracterizan por producir una mayor proporción de semillas con podredumbres o manchadas, particularmente en la campaña 2004. En este punto cabe mencionar, que no hay diferencias significativas en la producción de semillas manchadas en las líneas portadoras de resistencia genética a las razas locales de antracnosis.

### 3.3.4 Caracteres vinculados a la calidad

La semilla comercial se agrupó atendiendo a su calibre longitudinal. En función de la categoría a la que pertenece presenta diferente valor comercial. En la tabla 3.7 se observan los valores medios obtenidos y los resultados de la comparación de medias. Los rendimientos en calibre extra oscilaron entre el 84% de A1183 y el 33% de X1633. Dentro de las variedades indeterminadas, 'Cimera' y A2418 ofrecieron unos rendimientos significativamente menores en categoría extra (alrededor del 55%).

**Tabla 3.7.** Valores medios, error asociado a la media, número de medidas (N) y resultados de la comparación de medias para los diferentes calibres o categorías de semilla. Categoría extra: Longitud de la semilla > 22 mm; Categoría primera: 22 mm < Longitud semilla >20 mm; Categoría pequeña: Longitud de la semilla < 20 mm. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	Calibre longitudinal extra (%)		Calibre longitudinal primera (%)		Calibre longitudinal pequeño (%)				
		Media	Error	Media	Error	Media	Error			
Andecha	10	75,3	± 3,1	defg	22,3	± 2,6	abcde	2,4	± 0,6	a
Cimera	10	60,5	± 2,4	bc	36,7	± 2,2	fg	2,8	± 0,5	a
A1878	10	72,0	± 3,9	def	26,2	± 3,5	cde	1,8	± 0,5	a
A2418	10	55,3	± 2,0	b	41,3	± 1,8	g	3,4	± 0,5	a
A1183	10	84,6	± 2,5	g	14,6	± 2,2	a	0,8	± 0,5	a
A2438	10	76,0	± 4,8	defg	21,9	± 4,6	abcde	2,1	± 0,7	a
C1969	10	82,7	± 1,8	fg	16,8	± 1,8	ab	0,5	± 0,3	a
A1220	10	83,9	± 3,1	g	15,5	± 3,3	ab	0,6	± 0,3	a
A1258	10	66,8	± 4,3	cd	30,6	± 3,8	ef	2,6	± 0,6	a
A2806	6	74,4	± 3,1	defg	24,3	± 2,7	bcde	1,4	± 0,9	a
Xana	10	82,0	± 1,6	fg	17,4	± 1,5	abc	0,6	± 0,3	a
X1633	10	33,4	± 5,5	a	55,3	± 3,9	h	11,4	± 2,7	b
X1612	10	70,5	± 1,4	de	27,9	± 1,4	de	1,6	± 0,6	a
X1358	10	77,4	± 2,1	defg	22,1	± 2,0	abcde	0,5	± 0,2	a
X1319	10	79,3	± 1,6	efg	20,2	± 1,8	abcd	0,5	± 0,2	a
36	10	0,0	± 0,0		1,4	± 0,6		98,6	± 0,6	
93	10	24,0	± 1,9		58,4	± 1,5		17,6	± 1,3	

Las tablas 3.8 y 3.9 resumen los valores medios obtenidos en los dos años de evaluación para caracteres tradicionalmente vinculados a la calidad comercial como comportamiento en el remojo (absorción de agua a las 4 horas y a las 16 horas), proporción de piel y comportamiento en la cocción (integridad, tiempo de cocción e intervalo de cocción). En cuanto a la capacidad de absorción de agua de las semillas en el remojo previo a su procesado, es importante destacar que en las 4 primeras horas de remojo se produce el 90%-95% de la absorción con respecto al peso seco de la semilla, destacando los casos de las variedades X1358 y X1319 que superan el 100% de absorción en este tiempo. Además, a las 16 horas todas las líneas han absorbido más del 100% de su peso seco, es decir, duplican su peso. Las líneas A2418 y A2438 presentan una capacidad de absorción significativamente menor que el testigo 'Andecha'. En las líneas estudiadas no se detecta el problema de *testa dura (hardshell)* que se caracteriza por una absorción de agua limitada lo que supone un problema para la cocción (Castellanos y Guzmán-Maldonado, 1995). Los valores de absorción de agua son muy similares en todas las líneas.

**Tabla 3.8.** Valores medios, error asociado a la media, número de medidas (N) y resultados de la comparación de medias en los caracteres relacionados con la calidad comercial: capacidad de absorción de agua a las 4 y 16 horas y proporción de piel. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	C.A.A. 4 horas		C.A.A. 16 horas		Proporción piel (%)					
		Media	Error	Media	Error	N	Media	Error			
Andecha	15	97,6	± 1,4	bcd	113,2	± 1,5	bcde	20	6,9	± 0,1	defg
Cimera	15	92,7	± 0,6	abc	110,1	± 1,0	abc	20	6,8	± 0,1	cdef
A1878	15	99,3	± 2,9	cd	116,3	± 3,3	de	20	6,4	± 0,1	b
A2418	15	89,9	± 2,8	ab	107,2	± 2,1	a	20	6,0	± 0,1	a
A1183	15	95,8	± 2,7	abcd	111,8	± 1,4	abcd	20	6,5	± 0,1	bcd
A2438	15	92,0	± 4,1	abc	107,2	± 3,7	a	20	6,5	± 0,1	bc
C1969	15	94,3	± 2,5	abc	113,5	± 1,1	bcde	20	6,5	± 0,1	bcd
A1220	15	96,7	± 1,0	abcd	116,0	± 1,7	cde	20	6,7	± 0,1	bcde
A1258	15	92,5	± 1,1	abc	108,8	± 0,8	ab	20	7,2	± 0,2	gh
A2806	9	95,7	± 0,7	abcd	108,4	± 0,6	ab	12	6,3	± 0,2	ab
Xana	15	97,6	± 2,7	bcd	117,8	± 1,1	e	20	7,3	± 0,1	h
X1633	15	89,4	± 1,4	a	111,7	± 1,0	abcd	20	7,0	± 0,1	efgh
X1612	15	94,0	± 2,8	abc	112,9	± 0,8	abcde	20	6,9	± 0,1	defg
X1358	15	102,0	± 1,2	d	116,4	± 1,4	de	20	7,1	± 0,1	fgh
X1319	15	102,6	± 1,3	d	118,4	± 1,7	e	20	7,2	± 0,1	fgh
36	15	92,2	± 2,2		113,2	± 1,2		20	8,0	± 0,1	
93	15	89,9	± 2,6		117,4	± 0,9		20	8,8	± 0,1	

Las estimaciones de la proporción de piel oscilan entre el 6,0% de A2418 y 7,3% de 'Xana'. Como era de esperar, ya que es un carácter íntimamente relacionado con el tamaño de las semillas, las líneas determinadas mostraron una mayor proporción de piel que las indeterminadas (7,1% frente a 6,6%), en muchos casos significativamente mayor que el testigo 'Andecha'. Dentro de las líneas indeterminadas, A1878, A2418, y A2806 (todas con el gen *l*) mostraron una proporción de piel significativamente menor que el testigo.

Por lo que respecta al comportamiento tras la cocción, la tabla 3.9 muestra los valores de la integridad tras la cocción (expresada como proporción de semillas enteras) en un tiempo constante (35 minutos). Estos variaron entre 31% de la línea X1358 y 86% de semillas íntegras o enteras de la línea A2438. A1220 y A2438 presentaron una integridad significativamente mayor que el testigo 'Andecha'. El resto de las líneas tienen un comportamiento similar excepto en el caso de las líneas determinadas X1358 y X1633 que mostraron una integridad significativamente inferior. En general, las variedades determinadas presentan una menor proporción de semillas enteras que las indeterminadas (50% frente a 76%).

El tiempo de cocción estimado con el cocedor Mattson osciló entre 931 s de la línea A2806 y 1142 s de la línea A2418, el menor y mayor intervalo de cocción corresponde a las mismas líneas. La línea A2418 es la que más difiere del testigo, con unos valores significativamente superiores. A2418 y 'Cimera' presentan mayores intervalos de cocción y se

separan significativamente del testigo. Sin embargo, no parece que haya una clara correspondencia entre el tiempo de cocción Mattson, la integridad y la proporción de tegumento. Así, las líneas con mayor proporción de tegumento no son necesariamente las que mayor integridad o tiempo de cocción presentan.

**Tabla 3.9.** Valores medios, error asociado a la media, número de medidas (N) y comparación de medias para los diferentes caracteres relacionados con el comportamiento en la cocción: integridad (%), tiempo medio de cocción (s) e intervalo de cocción (s) en el cocedor Mattson. De acuerdo con el *test de Duncan*, las letras que acompañan a los valores indican sus diferencias: dos valores que coinciden en al menos una letra no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Material	N	Integridad (%)		N	Tiempo medio (s)		Intervalo (s)	
		Media	Error		Media	Error	Media	Error
Andecha	10	68,7	± 1,2 bc	15	992,7	± 20,7 ab	290,2	± 14,7 ab
Cimera	10	73,0	± 3,4 bcd	15	1104,3	± 52,6 bc	409,4	± 27,1 d
A1878	10	70,3	± 2,6 bcd	15	1063,6	± 32,3 abc	358,9	± 18,1 bcd
A2418	10	80,6	± 3,3 cdef	15	1142,1	± 51,5 c	577,2	± 23,3 e
A1183	10	81,7	± 2,9 cdef	15	1020,2	± 44,2 abc	365,9	± 17,2 bcd
A2438	10	86,3	± 2,7 ef	15	1044,3	± 65,8 abc	380,7	± 37,7 cd
C1969	10	82,9	± 2,4 def	15	1093,6	± 75,9 bc	348,4	± 27,4 abcd
A1220	10	87,4	± 2,4 f	15	995,2	± 38,4 ab	316,4	± 24,3 abc
A1258	10	65,6	± 6,9 b	15	943,7	± 22,9 a	370,6	± 22,3 cd
A2806	6	65,0	± 1,9 b	9	931,0	± 19,4 a	272,3	± 17,2 a
Xana	10	59,0	± 5,9 b	15	1090,1	± 29,9 bc	371,3	± 24,5 cd
X1633	10	38,5	± 6,1 a	15	1099,7	± 22,5 bc	384,8	± 16,2 cd
X1612	10	58,9	± 3,0 b	15	936,7	± 23,9 a	275,4	± 12,0 a
X1358	10	31,4	± 5,6 a	15	987,7	± 16,7 ab	319,7	± 16,9 abc
X1319	10	62,3	± 2,4 b	15	1048,1	± 37,6 abc	344,1	± 26,2 abcd
36	10	53,1	± 6,5	15	1187,1	± 20,1	342,7	± 30,8
93	10	23,2	± 9,3	15	949,8	± 40,0	467,8	± 64,2

## 3.4 Discusión

En este trabajo se evaluó desde diferentes perspectivas, el comportamiento en campo de las nuevas líneas derivadas de la variedad 'Andecha' portadoras de nuevos genes incorporados que participan en el control genético de la resistencia a patógenos (genes *Co-2*, *Co-3/Co-9*, *I*, *bc-3*) o en caracteres vinculados con la arquitectura de la planta (gen *Fin/fin*). Los resultados han revelado cierta variación para algunos caracteres analizados. En cuanto a las diferencias identificadas, se puede destacar la precocidad de las líneas determinadas (se cosechan unos 25 días antes) frente a las indeterminadas (ver tabla 3.4). También las líneas indeterminadas portadoras de resistencia genética a potyvirus se mostraron significativamente más precoces que las que carecían de esta resistencia. Se podría sugerir que las líneas mejoradas para resistencia a potyvirus contienen regiones genómicas procedentes de los donantes que confieren mayor precocidad. Estas regiones genómicas podrían localizarse junto a los genes de resistencia *I* y *bc-3* (en el apartado 4 de esta memoria, se muestran los resultados obtenidos en la localización de varios QTLs para caracteres fenológicos en el entorno del gen *I*), o bien, podrían localizarse en otras zonas independientes de estos genes. Alternativamente, se podría plantear la hipótesis de que las plantas infectadas con este patógeno retrasan su desarrollo, aunque en condiciones de invernadero, donde las plantas permanecen aisladas frente a potyvirus, también se mantienen estas diferencias.

En lo referente a los parámetros agronómicos vinculados con la producción (véase tabla 3.5), la mayor parte de las líneas disponen de un peso medio de 100 semillas en torno a los 100 gramos característico del tipo comercial Fabada. Sin embargo, las líneas X1633, X1319, A2418 y 'Cimera' disponen de un peso medio de 100 semillas menor y significativamente inferior al testigo 'Andecha'. Este dato se correlaciona con el menor rendimiento en calibre extra de estas líneas, inferior al 60%, lo que puede suponer un aspecto negativo en su valoración final.

Los resultados obtenidos para las producciones medias mostraron que las líneas determinadas producen cerca del 8% menos de vainas/m<sup>2</sup> y el 36% menos de producción bruta (g/m<sup>2</sup>). Esto supondría unas producciones en torno a los 1.800 kg/ha en las determinadas y 2.500 kg/ha en las indeterminadas, aunque estas estimaciones deberían tomarse con precaución dado que se extrapola a partir de parcelas cuya superficie es pequeña, se aproximan a los datos que aportan los agricultores. Finalmente, cabe destacar la mayor producción obtenida en las líneas portadoras de resistencia a potyvirus (A1878, A2418 y A2806) frente al testigo 'Andecha' lo que supone una valoración positiva ante la posible liberación de materiales.

La producción y composición del destrío resultaron altamente variables, como se observa en las tablas 3.5 y 3.6. Este carácter está muy influido por el ambiente. Los resultados revelaron

que las líneas determinadas presentaban una mayor proporción de semilla deteriorada (32% frente a 20% en las indeterminadas). Los valores medios obtenidos en las diferentes clases de semilla deteriorada no mostraban claras diferencias significativas entre las líneas portadoras de resistencia genética a antracnosis frente a las no portadoras de esta resistencia, es decir, no presentaban unos porcentajes de semillas manchadas inferiores a las no portadoras de esta resistencia. Esto puede explicarse porque en 2004 y 2005 los ataques de antracnosis en las parcelas de Villaviciosa no fueron graves. El testigo 'Andecha' presentó leves síntomas de este patógeno en vaina y semilla mientras que en los materiales con resistencia no se encontraron síntomas evidentes de haber sufrido su ataque. No obstante, los resultados de las inoculaciones artificiales confirman que las líneas A1878, A2418, A1183, C1969, A1220, A1258, A2806, X1612, X1358 y X1319 son resistentes frente a las razas locales 3, 6, 19, 38 y 102 (Ferreira *et al.*, 2002; Rodríguez Suárez, 2005). Además dentro de las líneas determinadas, la arquitectura de la planta parece jugar un papel determinante, los menores niveles de semillas con podredumbres (véase figura 3.8 y tabla 3.6) se encontraron en la línea X1633 que dispone de una planta que se mantiene erecta (hábito Ia) hasta la recolección. En las otras líneas, en mayor o menor medida las plantas terminan tumbándose por lo que un mayor número de vainas entran en contacto con el suelo con mayor riesgo de pudrirse.

El tipo comercial Fabada es altamente valorado por sus características de calidad destacando en los paneles de cata (Sanz y Atienza, 1998). Resulta deseable que las nuevas líneas tengan un comportamiento similar al testigo 'Andecha'. Para ello y como paso previo a posteriores evaluaciones de calidad sensorial, se estimaron diferentes parámetros vinculados con la calidad (Guzmán – Maldonado *et al.*, 1995). En general, los valores de absorción de agua son muy similares en todas las líneas y tras 16 horas de remojo duplican ampliamente su peso seco inicial (ver tabla 3.8). El interés que tiene el comportamiento en remojo radica en que se ha descrito una correlación entre el tanto por ciento de absorción de agua y el tiempo de cocción (Jacinto *et al.*, 2002; Pérez-Herrera *et al.*, 2002), de modo que una rápida y elevada absorción de agua favorece tiempos de cocción relativamente cortos.

En cuanto a la proporción de piel, se observa que es muy similar en todas las líneas, aunque destacan las variedades determinadas (con menor tamaño de semilla) que disponen de una mayor proporción. Este resultado es coherente ya que ambos parámetros están íntimamente relacionados. Los valores obtenidos para este parámetro, se corresponden con una baja percepción de la piel en los análisis sensoriales de Faba Granja, aunque esta percepción, parece depender de la composición molecular del tegumento de las semillas y no del porcentaje respecto al peso total de las mismas (Casañas *et al.* 2002).

Otros caracteres analizados y vinculados a la calidad, de gran interés para elaboradores y consumidores, fueron los relacionados con el comportamiento en la cocción. Una propiedad

valorada positivamente por el consumidor es que las semillas se mantengan íntegras tras la cocción. En este punto conviene señalar, que el tiempo óptimo de cocción estimado para realizar este tipo de análisis en las condiciones del laboratorio y para la variedad 'Andecha', es de 35 minutos. Para el carácter integridad se ha encontrado que la rotura de semillas fue más frecuente en las variedades determinadas. Esto podría indicar:

a) Que la proporción de piel no es un factor determinante en la rotura de las semillas durante la cocción aunque algunos autores así lo han indicado (Krista *et al.*, 1994; Jacinto y Fernández, 1993). Como se ha mencionado, en general los materiales determinados disponían de mayor proporción de tegumento.

b) Que las variedades determinadas precisarían de menores tiempos de cocción aunque este hecho no es corroborado por unos menores tiempos de cocción en el cocedor Mattson.

Respecto al intervalo de cocción óptimo estimado con el cocedor Mattson, se encontraron algunas diferencias significativas frente al testigo 'Andecha'. Los mayores intervalos presentados por las líneas A2418 y 'Cimera' sugieren una mayor heterogeneidad dentro de las muestras para este carácter.

Las 14 líneas tipo comercial Fabada, que se evalúan en este trabajo han sido desarrolladas a través de programas de mejora genética clásicos (retrocruzamientos y cruzamientos sencillos más selección individual) en los que se pretendía modificar caracteres de la variedad 'Andecha'. Para el desarrollo de estas líneas, en muchos casos se ha partido de líneas donantes muy diferentes e incluso muy distantes filogenéticamente a faba Granja (Pañeda *et al.*, 2005; ver figura 3.4). En este punto, es importante mencionar, que los parentales utilizados para desarrollar las variedades mejoradas proceden de grupos de germoplasma distintos: Andecha pertenece al grupo de germoplasma andino frente a A252, A493, Sanilac; A321 y BRB130 que pertenecen al mesoamericano. Esto sugiere que a pesar de que se ha descrito la existencia de incompatibilidades en los cruzamientos entre ambos acervos genéticos (Singh y Gutiérrez, 1984; Gepts y Bliss, 1985), el resultado obtenido en este trabajo ha sido satisfactorio. Por otro lado, es posible que además de la incorporación de los alelos deseados se hayan conservado otras regiones genómicas procedentes de los parentales donantes como regiones ligadas o próximas a los *loci* manejados u otras regiones que participan en el control de caracteres no sometidos a selección en el proceso de mejora. Así, Méndez de Vigo (2002) identifica restos del parental donante en el genoma de algunas de estas líneas esencialmente derivadas. Estas diferencias con el parental 'Andecha' podrían relacionarse con las diferencias encontradas en este trabajo.

Como estrategia de mejora se ha buscado incorporar diferentes combinaciones de genes de resistencia desde diversas fuentes, dado que es previsible que cuando se extienda el cultivo

de variedades resistentes, los patógenos locales evolucionen y superen las resistencias introducidas (Parlevliet, 2002; Miklas *et al.*, 2006). Previendo ese supuesto, se han desarrollado paralelamente diferentes líneas portadoras de distintas combinaciones de genes de resistencia. En el momento en que las resistencias liberadas sean superadas, se evaluará el comportamiento de las líneas reservadas y si los resultados son positivos, serán liberadas.

Los genes o combinaciones genéticas incorporadas mediante los programas de mejora genética aportan una serie de diferencias frente a la variedad 'Andecha' que pueden traducirse en ciertas ventajas y/o desventajas. Así, el carácter hábito de crecimiento determinado, controlado por el gen *Fin/fin*, implica que el tallo termine en inflorescencia y se detenga el crecimiento de modo que la planta presenta una altura limitada. Esta modificación en la arquitectura de la planta, evita el empleo de tutores en el cultivo lo que conlleva unos cambios significativos en su manejo, horas de trabajo, posibilidad de mecanización de la recolección, etc. En cambio, esta arquitectura de la planta favorece que las vainas entren en contacto con el suelo y la semilla puede pudrirse. Por su parte, los genes de resistencia ofrecen protección frente a los patógenos, de modo que la enfermedad no progresa y las mermas que podría ocasionar se minimizan. Si bien es cierto que existen estrategias convencionales para limitar el desarrollo de las enfermedades, como la aplicación de fitosanitarios o la utilización de semilla saneada (Hall y Nasser, 1996), en ocasiones son poco efectivas y pueden tener efectos secundarios sobre el medio o la planta. En el caso de virosis la protección mediante estrategias convencionales es muy complicada. Las variedades resistentes, que minimizan la necesidad de utilizar fitosanitarios para el control de las enfermedades, encajan mejor en un modelo de agricultura sostenible. Finalmente, la precocidad entendida como un adelanto en la cosecha es un carácter interesante dado que el cultivo queda menos expuesto a factores de estrés biótico (resistencia por evitación) y abiótico. Además, esto supone realizar la recolección a finales de agosto evitando posibles lluvias a principios de septiembre, habituales en la Cornisa Cantábrica, que dificultan el secado de las vainas y su posterior conservación (favorecen la aparición de manchas en las semillas y con ello, su depreciación).

En este trabajo se aportan datos acerca del comportamiento de las variedades desarrolladas en el SERIDA durante dos años de evaluación. Los valores medios obtenidos fueron bastante estables en ambos, de modo que en cada campaña los materiales con mayores/menores valores generalmente fueron los mismos. Esta evaluación se ha limitado a un sólo ambiente (Villaviciosa) para evitar liberaciones incontroladas (cruzamientos naturales o mezclas mecánicas) que afecten a la estrategia de protección frente a los patógenos locales y por la complejidad de su realización en varias localidades. Los resultados han revelado la necesidad de continuar con la mejora genética, particularmente en los hábitos de crecimiento determinados, dado que no se dispone de líneas con fenotipo de semilla Fabada en las que se agrupe una arquitectura determinada erecta y resistencia frente a razas locales de antracnosis y

virosis (BCMV + BCMNV). Los resultados mostraron también que las líneas esencialmente derivadas de 'Andecha' presentan unas características dentro del tipo comercial Fabada (semilla blanca, oblonga y muy grande) y son muy similares a ella. Las diferencias encontradas en su comportamiento, que pueden calificarse como ventajas y desventajas, ofrecen la oportunidad de seleccionar aquellas que más se ajusten a los intereses de los productores, envasadores, consumidores y empresas de semillas.

**4.\_ Incorporación de caracteres cuantitativos morfo-agronómicos y de calidad de semilla al mapa genético de judía**

---



## 4.1 Introducción

### 4.1.1 Mapas genéticos en judía

Un mapa genético es una representación de la disposición relativa de los genes obtenida a partir de las frecuencias de recombinación entre los loci manejados. Resulta por tanto, muy útil en el análisis del genoma siendo, cada vez con más frecuencia, un componente clave en los programas de mejora vegetal (Collard *et al.*, 2005). La ubicación de un gen en un mapa de ligamiento, permite predecir las proporciones con que aparecerá asociado con otros genes de interés en la descendencia de determinados cruzamientos.

En judía común se han elaborado varios mapas genéticos con diferentes tipos de marcadores moleculares. Entre los publicados hasta la fecha, cabe destacar el mapa consenso desarrollado en la Universidad de Wisconsin por Freyre *et al.* (1998) que integra otros tres mapas publicados anteriormente: a) mapa elaborado en la Universidad de Florida (Vallejos *et al.*, 1992), b) mapa elaborado en la Universidad de California, Davis (Nodari *et al.*, 1993) y c) mapa elaborado en la Universidad de París (Adam-Blondom *et al.*, 1994). Estos mapas incluyen principalmente marcadores moleculares tipo RAPDs y RFLPs. Más recientemente, Blair *et al.* (2003) publicaron un nuevo mapa genético utilizando 100 marcadores tipo microsatélite y Rodríguez-Suárez *et al.* (2007b) presentaron un mapa donde se ubicaron entre otros, 10 loci implicados en la resistencia genética a razas específicas de antracnosis. La correspondencia entre los diferentes grupos de ligamiento, comúnmente denominados B1 a B11 que componen los mapas publicados, se establece en base a marcadores comunes, principalmente marcadores tipo RFLP.

En muchos de estos mapas, el número de grupos de ligamiento descritos, coincide con el número de pares de cromosomas ( $2n=22$ ). Pedrosa *et al.* (2003) integraron mediante técnicas de hibridación "in situ" con fluorescencia, los grupos de ligamiento del mapa genético descrito por Vallejos *et al.* (1992) y los 11 cromosomas del complemento haploide de esta especie.

Todos los mapas genéticos desarrollados utilizan parentales pertenecientes a diferentes acervos genéticos o distantes desde el punto de vista genético, a fin de maximizar el número de diferencias genéticas. Los tipos de segregaciones analizadas para la elaboración de estos mapas genéticos fueron  $F_2$ ,  $Bc_1F_1$  o RILs (líneas recombinantes consanguíneas). En los últimos años se observa una tendencia a emplear RILs en la elaboración de mapas genéticos por las ventajas que proporciona este tipo de población de mapeo. Entre ellas, puede destacarse, que se trata de poblaciones permanentes que se pueden propagar indefinidamente. Esta particularidad permite realizar diferentes evaluaciones sobre una misma línea, lo que resulta imprescindible en la localización de caracteres cuantitativos (QTLs) debido al efecto del ambiente

en la expresión de este tipo de caracteres. Por otro lado, las RILs presentan un elevado nivel de recombinación, por lo que su uso es muy eficaz en la elaboración de mapas genéticos. Además, es fácil mantenerlas o conservarlas en el tiempo, sólo es necesario multiplicarlas periódicamente para mantener viable el material. Por otra parte, las estimaciones de las fracciones de recombinación entre los loci son más sencillas al desaparecer los heterocigotos.

Los mapas genéticos generales desarrollados en judía, disponen de un limitado número de loci implicados en el control genético de caracteres cuantitativos (QTLs) de interés para la mejora genética: resistencias, caracteres morfológicos y caracteres agronómicos. Esto es debido en parte, a que no todas las poblaciones segregantes presentan polimorfismos para dichos caracteres, aunque este inconveniente se ha comenzado a solventar mediante la localización indirecta a través de marcadores descritos como ligados a loci de interés.

Algunos ejemplos de localización de QTLs en otros mapas descritos en la especie se describen a continuación: QTLs relacionados con resistencia a enfermedades como los desarrollados por Jung *et al.* (1999) y Miklas *et al.* (2003) para resistencia a *Pseudomonas syringae*; los descritos en moho blanco (Miklas *et al.*, 2001; Kolkman y Kelly, 2003) y en fusarium (Schneider *et al.*, 2001). Localización de QTLs de interés agronómico o morfológico como pueden ser: dimensiones de vaina, dimensiones de semilla, número de semillas por vaina, etc. (Tsai *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Tar'an *et al.*, 2003; Frei *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2006b). En este punto, cabe destacar, que los resultados obtenidos por estos autores en cuanto a la posición relativa de los QTLs, son distintos. Por ejemplo, el carácter días hasta la recolección se localiza según Blair *et al.* (2006b) en los grupos de ligamiento B1, B5, B6 y B7 y en los grupos B9 y B10 según Tar'an *et al.* (2002).

Lo expuesto anteriormente explica que hasta la fecha y como ocurre en la mayoría de las especies vegetales, la utilización práctica de esta herramienta molecular en judía, ha sido limitada.

#### **4.1.2 Mapa genético 'Xana'/Cornell 49242**

La Universidad de Oviedo, en colaboración con el SERIDA, ha desarrollado un mapa genético en una población de líneas recombinantes consanguíneas (RILs) derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242. Este mapa genético fue iniciado por Pañeda (2005), analizando 244 marcadores moleculares: 178 fragmentos AFLP, 18 microsatélites, 28 SCARs, 4 CAPs, 12 RAPDs y 4 marcadores morfológicos. Más adelante, Rodríguez-Suárez, 2005 incorporó 7 loci de resistencia a antracnosis organizados en tres cluster localizados en los grupos de ligamiento B4 y B11. Posteriormente Campa (2006), incluyó 13 loci de proteínas de semilla y finalmente Sánchez (2006) añadió 31 marcadores tipo ISSR y 7 loci tipo microsatélite.

Para su elaboración, se utilizó el programa JoinMap v.3 (van Ooijen and Voorrips, 2001). Actualmente, y bajo el criterio de LOD > 2,5, el mapa incluye 302 loci distribuidos en 11 grupos de ligamiento. La longitud total del mapa genético es de 1014 cM y la distancia media entre marcadores es de 3,54 cM. Un resumen de este mapa y la disposición de los marcadores se muestran más adelante en la tabla 4.1 y en la figura 4.2.

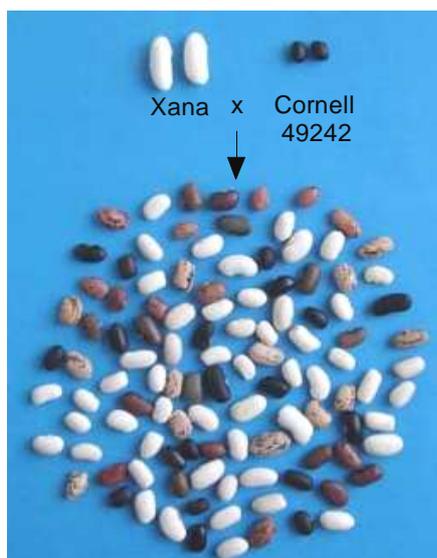
### **4.1.3 Objetivos**

La localización en el mapa genético de caracteres de importancia económica en el cultivo de la judía, puede favorecer el desarrollo de cultivares mejorados y más adaptados a condiciones ambientales específicas. El objetivo de este trabajo es, localizar loci vinculados a caracteres cuantitativos (QTLs) de interés agronómico, fenológicos y relacionados con la calidad en el mapa genético de judía común obtenido en la población de líneas recombinantes 'Xana'/Cornell 49242.

## 4.2. Material y Métodos

### 4.2.1 Material vegetal

La población de líneas recombinantes (RILs) utilizadas en este trabajo, han sido desarrolladas por medio del “método de descendiente único” (SSD; Fehr, 1987). Se utilizaron un total de 104 líneas recombinantes, mayoritariamente  $F_{2:8}$ , derivadas del cruzamiento entre las variedades ‘Xana’ (♀) y Cornell 49242 (♂). El parental ‘Xana’ es una variedad comercial obtenida en el SERIDA que presenta un hábito de crecimiento determinado (tipo I) y una semilla dentro del tipo faba Granja como se observa en la figura 4.1. El parental Cornell 49242 es una variedad diferencial de antracnosis, presenta una semilla muy pequeña de color negro, mate y hábito de crecimiento indeterminado rastrero (tipo III). Estas dos variedades pertenecen a acervos genéticos distintos, lo que favorece un mayor grado de polimorfismo a nivel morfológico y molecular.



**Figura 4.1.** Fenotipo de semilla de los parentales ‘Xana’ y Cornell 49242 y muestra de una semilla de cada una de las líneas recombinantes consanguíneas ( $F_{2:8}$ ).

### 4.2.2 Mapa genético ‘Xana’/Cornell 49242

El mapa genético desarrollado en las líneas recombinantes consanguíneas derivadas del cruzamiento ‘Xana’ x Cornell 49242 (Pañeda, 2005; Rodríguez-Suárez, 2005; Campa, 2006; Sánchez, 2006) se representa en la figura 4.2. En el momento de iniciarse este trabajo el mapa estaba constituido por 178 marcadores AFLPs, 25 marcadores microsatélites, 28 marcadores SCARs, 4 marcadores CAPs, 12 RAPs, 13 loci de proteínas de semilla, 7 resistencias, 31 marcadores ISSRs, y 4 marcadores morfológicos distribuidos en 11 grupos de ligamiento (véase tabla 4.1). Por tanto, el grado de saturación de este mapa es alto. En la tabla 4.1 se observa la distribución de estos marcadores en los distintos grupos de ligamiento.

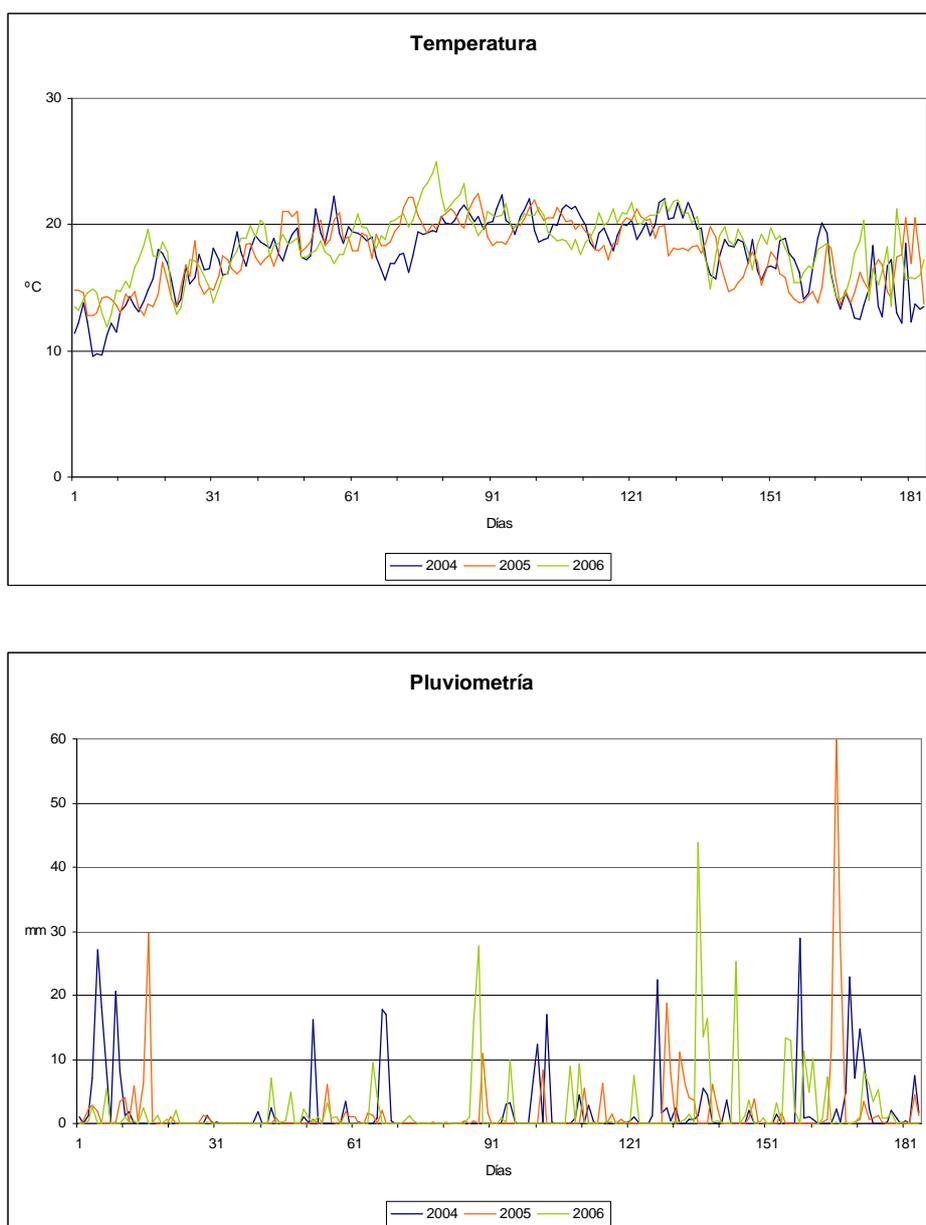
**Tabla 4.1.** Número y tipo de marcadores localizados en los 11 grupos de ligamiento del mapa 'Xana'/Cornell 49242.

	Grupos de ligamiento											Total
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Nº marcadores AFLPs	13	19	20	10	14	16	10	22	18	10	26	178
Nº marcadores microsatélites	4	1	4	1	6	2	3	0	3	1	0	25
Nº marcadores SCARs	3	3	2	8	1	2	2	3	1	1	2	28
Nº marcadores CAPs	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	4
Nº marcadores RAPs	2	3	2	0	1	2	0	1	0	0	1	12
Nº proteínas de semilla	1	0	1	5	0	0	6	0	0	0	0	13
Nº marcadores ISSRs	5	2	3	3	5	3	1	2	2	1	4	31
Nº resistencias genéticas	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	4	7
Nº marcadores morfológicos	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4
Total	29	29	34	30	27	25	24	28	24	13	39	302
Distancia media entre marcadores (cM)	2,7	4,3	3,7	3,6	2,7	4,8	3,8	3,6	3,5	3,7	2,4	



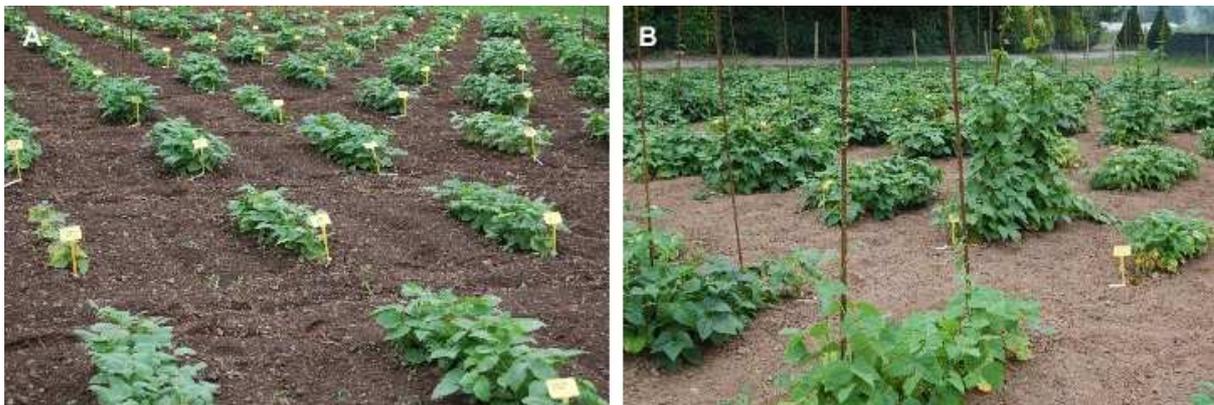
### 4.2.3 Ensayos de campo

Los ensayos de evaluación se llevaron a cabo en parcelas del SERIDA situadas en Villaviciosa (Asturias) ( $43^{\circ}29'01''\text{N}$ ,  $5^{\circ}26'11''\text{W}$ , 6,5 msnm), durante los meses de mayo a octubre en los años 2004, 2005 y 2006 (véase figura 4.4). Los datos climáticos para los meses en que se realizó el cultivo en campo pueden encontrarse en la dirección <http://infomet.am.ub.es/infomet/clima/gijon/>. La temperatura y la pluviometría se muestran de forma detallada en la figura 4.3.



**Figura 4.3.** Registro de la temperatura y la pluviometría durante los meses de mayo a octubre en los tres años de cultivo. En el eje de abscisas, 1 corresponde al 1 de mayo, 181 al 31 de octubre.

El cultivo se desarrolló sobre un suelo con textura franco-arenosa siguiendo las recomendaciones de Fueyo (2004) en su manejo. Para las líneas indeterminadas, se emplearon tutores de varilla de hierro de 12 mm de diámetro y 2,5 m de longitud. Los ensayos constaban de 2 o 3 repeticiones por línea, distribuidas al azar en líneas de cultivo de 1 m de longitud (12 plantas/línea). El marco de plantación fue de 1,20 x 0,10 m. Para los parentales 'Xana' y Cornell 49242, las repeticiones por año fueron 4.



**Figura 4.4.** A. Estadios iniciales del cultivo de las líneas recombinantes en parcelas de Villaviciosa (2006). B. Estado más avanzado del cultivo de las RILs en el mismo año. Se observa la diferente arquitectura de la planta en cada línea recombinante.

Aquellas parcelas con bajas significativas en el número de plantas y/o problemas en su desarrollo fueron descartadas para los análisis.

#### 4.2.4 Caracteres analizados

Se evaluaron un total 17 caracteres cuantitativos: fenológicos, vinculados a la calidad o de interés morfo-agronómico. Se trata de caracteres comúnmente utilizados en las caracterizaciones y evaluaciones dentro de esta especie. Para realizar estas evaluaciones, las semillas una vez cosechadas se secaron en invernadero hasta que alcanzaron una humedad del 12-15%. Posteriormente permanecieron en cámara a -20 °C durante 48 horas para evitar problemas de gorgojo (Fueyo, 2004). Para su conservación las semillas se guardan en botes de cristal herméticos en una cámara de refrigeración con una temperatura de 4 °C y humedad relativa del 30-35%.

##### **Caracteres morfo-agronómicos**

- *Longitud del foliolo central de la hoja (LL)* (cm). Longitud media del foliolo central de 10 hojas tomadas al azar. Se toma la medida desde la inserción del pecíolo hasta el ápice de la hoja.

- 
- *Ancho del foliolo central de la hoja* (LW) (cm). Anchura media del foliolo central de 10 hojas tomadas al azar. Se mide en la parte más ancha del foliolo, perpendicularmente al nervio central.
  - *Longitud de la vaina* (PL) (cm). Longitud media de 10 vainas extendidas en estado de verdeo tomadas al azar.
  - *Ancho de la vaina* (PW) (mm). Anchura media a la altura de la segunda semilla desde el punto de inserción de la vaina, de 10 vainas extendidas en estado de verdeo tomadas al azar. Se mide perpendicularmente a la longitud.
  - *Grueso de la vaina* (PH) (mm). Media de 10 vainas en estado de verdeo tomadas al azar, del grosor a la altura de la segunda semilla desde el punto de inserción. Se toma transversalmente a la longitud.
  - *Longitud de la semilla* (SL) (mm). Longitud media de 10 semillas tomadas al azar de cada muestra.
  - *Ancho de la semilla* (SWi) (mm). Anchura media de 10 semillas tomadas al azar de cada muestra, se mide perpendicularmente al hilum.
  - *Grueso de la semilla* (SH) (mm). Grosor medio de 10 semillas tomadas al azar de cada muestra y medido transversalmente al hilum.
  - *Nº semillas/vaina* (SP). Número medio de semillas estimado en 10 vainas tomadas al azar.

### **Caracteres vinculados a la calidad**

La metodología seguida para evaluar el comportamiento tras el remojo y la proporción de piel fue adaptada de Guzmán-Maldonado *et al.* (1995).

- *Peso medio de la semilla* (SW) (g). Se estima a partir de tres lotes de 10 semillas por muestra tomadas al azar.
- *Capacidad de absorción de agua* (CA4 y CA16) (%). Se toman al azar 3 muestras de 25 semillas por cada repetición y se ponen a remojo en agua destilada a temperatura ambiente. Se determina el peso de las 25 semillas antes y después del remojo, transcurridas 4 horas y 16 horas. La capacidad de absorción a las 4 y 16 horas de remojo se cuantifica mediante la siguiente fórmula (Bressani *et al.*, 1988; Guzmán-Maldonado *et al.*, 1995).

$$\text{Capacidad de absorción} = \frac{(\text{Peso en remojo (g)} - \text{Peso seco (g)})}{\text{Peso seco (g)}} \times 100$$

Donde:

*Peso en remojo (g)*: Peso medio de 25 semillas tras remojo en agua destilada durante 4 y 16 horas.

*Peso seco (g)*: Peso medio de 25 semillas antes de iniciar la hidratación.

- *Proporción de piel de las semillas (PP) (%)*. Se toman al azar 4 lotes de 5 semillas por cada muestra y se ponen a remojo en agua destilada a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separa el tegumento (o piel) del albumen con ayuda de un bisturí y se someten a secado forzoso en estufa a 80 °C durante 8 días. Transcurrido ese periodo de secado, se pesa el tegumento y el albumen. La proporción de piel se estima aplicando la siguiente fórmula (Elías *et al.*, 1986):

$$\text{Proporción de piel} = \frac{\text{Peso tegumento (g)}}{\text{Peso tegumento (g)} + \text{Peso albumen (g)}} \times 100$$

### **Caracteres fenológicos**

En este apartado los caracteres considerados fueron (según Debouck e Hidalgo, 1985):

- *Días al inicio de floración (IF) (días)*: días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas de la parcela presentan la primera flor abierta.

- *Días al final de floración (FF) (días)*: días transcurridos desde la siembra hasta que la mayor parte de las plantas carecen de flores abiertas.

- *Días a la cosecha de verdeo (V) (días)*: días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas desarrolladas tienen las vainas en su estado óptimo para su consumo en verde (vaina totalmente desarrollada en su longitud y semillas iniciando su engrosamiento).

- *Días a la recolección (R) (días)*: días transcurridos desde la siembra hasta que las vainas están secas, la humedad de la semilla entorno al 15% y alcanzan su coloración típica.

## 4.2.5 Localización de los QTLs en el mapa genético

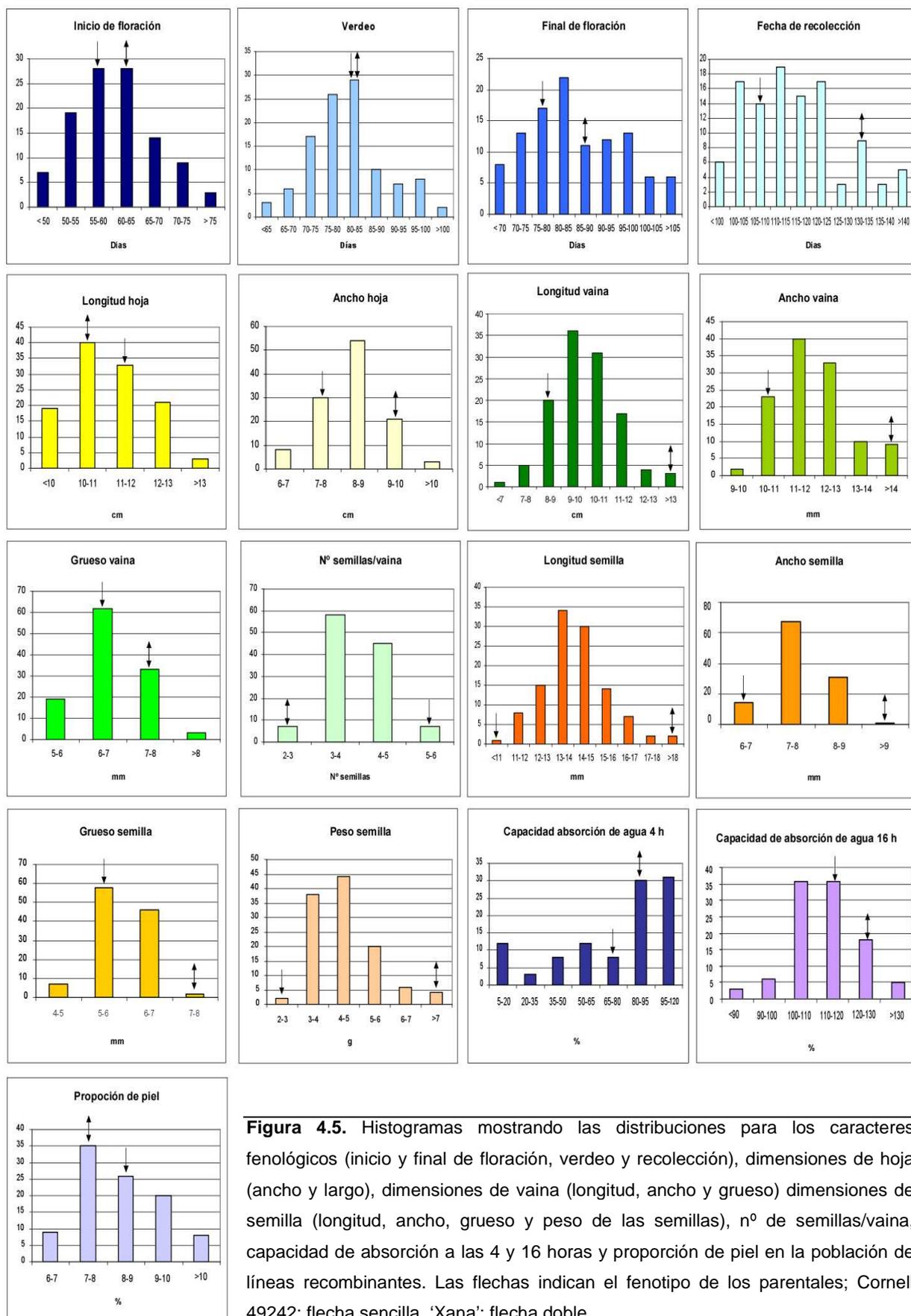
La localización de los caracteres cuantitativos en el mapa genético se llevó a cabo utilizando el programa Windows QTL Cartographer v.2.5 (Wang *et al.*, 2006) a partir del mapa previamente construido con el programa JoinMap v.3 (van Ooijen and Voorrips, 2001). Los QTLs se localizaron mediante un análisis CIM (*composite interval mapping*) con unas condiciones restrictivas. El análisis CIM se llevó a cabo grupo de ligamiento a grupo de ligamiento en un intervalo cromosómico de 2 cM, con 300 permutaciones y con un 5% de nivel de significación. Los criterios considerados para la identificación de QTLs fueron  $LOD \geq 3$  y la proporción de variación explicada,  $R^2 \geq 10\%$ .

Para contrastar la hipótesis de que los resultados de los caracteres analizados se ajustan a una distribución normal, se utilizó el *test Kolmogorov – Smirnov* ( $p \geq 0,01$ ). Las posibles diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los parentales o entre los grupos de líneas en función de su genotipo para un marcador determinado se investigaron mediante la comparación de medias utilizando la *prueba T de Student* a un nivel de significación  $p \leq 0,05$ . Se midió el coeficiente de correlación (*Pearson*) con un nivel de significación  $p \leq 0,05$  entre los caracteres cuantitativos. Los análisis estadísticos fueron realizados con la ayuda del programa informático SPSS v.12.0.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Variación fenotípica en las RILs

En la figura 4.5 se representa mediante histogramas la distribución de los caracteres cuantitativos analizados en la población de líneas recombinantes. Los detalles en cuanto a la media y error de cada uno de los caracteres cuantitativos analizados para cada una de las líneas recombinantes se incluyen en el CD que acompaña a esta memoria. Todos los caracteres, salvo la capacidad de absorción de agua a las 4 horas, presentan una variación que podría considerarse una distribución normal (*test Kolmogorv – Smirnov*;  $p \geq 0,01$ ). Además, en todos los caracteres aparecen clases distintas a las de los parentales, líneas intermedias y/o líneas mayores o menores que las de los parentales (segregación transgresiva). Por ejemplo, en el carácter días a la recolección aparecen clases intermedias entre ambos parentales, clases más precoces que el parental más precoz (Cornell 49242) y clases menos precoces que el parental menos precoz 'Xana'.



**Figura 4.5.** Histogramas mostrando las distribuciones para los caracteres fenológicos (inicio y final de floración, verdeo y recolección), dimensiones de hoja (ancho y largo), dimensiones de vaina (longitud, ancho y grueso) dimensiones de semilla (longitud, ancho, grueso y peso de las semillas), nº de semillas/vaina, capacidad de absorción a las 4 y 16 horas y proporción de piel en la población de líneas recombinantes. Las flechas indican el fenotipo de los parentales; Cornell 49242: flecha sencilla, 'Xana': flecha doble.

La tabla 4.2 muestra la media y el intervalo de variación de los parentales y de la población de líneas recombinantes para cada carácter estudiado en los tres años de evaluación. Además se indican, mediante una *prueba T de Student*, las diferencias significativas entre los parentales para los caracteres cuantitativos sometidos a evaluación.

Los fenotipos de 'Xana' y Cornell 49242 muestran diferencias significativas para los caracteres analizados salvo en los casos: longitud del foliolo central de la hoja, inicio y final de floración y verdeo. Los valores máximo y mínimo que presentan las líneas recombinantes para estos caracteres, indican que en todos los casos aparece un amplio rango de variación. Por otro lado, cabe destacar que analizando el fenotipo de semilla de las RILs no existe ninguna línea cuyo fenotipo sea igual al de 'Xana'.

**Tabla 4.2.** Valores medios y error para los 17 caracteres cuantitativos analizados en las líneas recombinantes y de los parentales. En las RILs se indica el intervalo de variación. En los parentales, se señala el resultado de la *prueba T de Student*. \*\* $p \leq 0,01$  \* $0,01 > p \leq 0,05$  ns  $p > 0,05$ .

Carácter (unidad)	Fenotipo en los parentales					Fenotipo en RIL's			
	Xana		Cornell 49242		<i>p</i>	Rango		Máximo	Mínimo
	Media	Error	Media	Error		Media	Error		
Longitud foliolo central (cm)	10,9	± 0,1	11,0	± 0,2	ns	11,1	± 0,1	13,2	9,0
Ancho foliolo central (cm)	9,3	± 0,1	7,7	± 0,1	**	8,3	± 0,1	10,2	6,4
Longitud vaina (cm)	13,7	± 0,2	8,3	± 0,1	**	9,9	± 0,1	13,3	7,0
Ancho vaina (mm)	14,4	± 0,1	10,8	± 0,1	**	11,9	± 0,1	15,0	10,3
Grueso vaina (mm)	7,4	± 0,2	6,7	± 0,1	**	6,7	± 0,1	8,3	5,2
Nº semillas/vaina	3,0	± 0,1	5,5	± 0,1	**	3,9	± 0,1	5,2	2,8
Longitud semilla (mm)	22,4	± 0,2	9,6	± 0,1	**	14,1	± 0,2	19,4	11,4
Ancho semilla (mm)	9,5	± 0,1	6,6	± 0,0	**	7,7	± 0,1	8,9	6,3
Grueso semilla (mm)	7,4	± 0,1	5,5	± 0,1	**	5,9	± 0,1	7,1	4,3
Peso semillas (g)	8,5	± 0,6	2,3	± 0,1	**	4,5	± 0,1	9,4	3,1
Capacidad absorción agua 4 h (%)	103,5	± 2,1	88,6	± 2,1	**	71,4	± 0,1	116,5	5,5
Capacidad absorción agua 16 h (%)	124,4	± 3,4	114,5	± 1,8	*	110,4	± 3,2	136,5	66,8
Proporción de piel (%)	7,7	± 0,2	8,0	± 0,1	*	8,3	± 1,2	12,6	6,6
Inicio floración (días)	60,4	± 0,8	57,4	± 1,6	ns	60,4	± 0,8	86,8	46,0
Verdeo (días)	77,9	± 2,6	77,6	± 1,0	ns	80,3	± 0,8	103,5	62,4
Final floración (días)	85,6	± 2,6	78,9	± 2,3	ns	85,0	± 1,1	111,0	57,3
Recolección (días)	130,2	± 8,9	103,6	± 2,7	*	115,4	± 1,2	150,0	92,5

En la tabla 4.3 se muestran las correlaciones estimadas entre los diferentes caracteres analizados. Los resultados revelaron una fuerte correlación entre, por ejemplo, todos los caracteres fenológicos evaluados, todos los caracteres relacionados con las dimensiones de semilla y para todos los caracteres de las dimensiones de vaina.

**Tabla 4.3.** Valores estimados para la *correlación de Pearson* de los 17 caracteres analizados. Se indica, el nivel de significación: \*\* $p \leq 0,01$  \* $0,01 > p \leq 0,05$  ns  $p > 0,05$ .

	Longitud foliolo central (cm)	Ancho foliolo central (cm)	Longitud vaina (cm)	Ancho vaina (mm)	Grueso vaina (mm)	Nº semillas/ vaina	Longitud semilla (mm)	Ancho semilla (mm)	Grueso semilla (mm)	Peso semilla (g)	C.A.A. 4 h (%)	C.A.A. (%)	Proporción piel (%)	Inicio floración (días)	Verdeo (días)	Final floración (días)	Recolección (días)
Longitud foliolo central (cm)																	
Ancho foliolo central (cm)	0,64**																
Longitud vaina (cm)	0,15ns	0,11ns															
Ancho vaina (mm)	-0,09ns	0,23*	0,33**														
Grueso vaina (mm)	0,04ns	0,20*	-0,22*	0,22*													
Nº semillas/vaina	0,20*	-0,23*	0,20ns	-0,51**	-0,34**												
Longitud semilla (mm)	-0,14ns	0,23*	0,53**	0,58**	0,23*	-0,46**											
Ancho semilla (mm)	0,04ns	0,39**	0,19ns	0,56**	0,25**	-0,42**	0,73**										
Grueso semilla (mm)	0,12ns	0,34**	0,03ns	0,23*	0,49**	-0,23*	0,38**	0,49**									
Peso semillas (g)	-0,06ns	0,30**	0,43**	0,54**	0,33**	-0,42**	0,83**	0,74**	0,57**								
Capacidad absorción agua 4 h (%)	0,01ns	-0,18ns	0,22*	0,08ns	-0,06ns	0,04ns	-0,04ns	-0,19**	-0,23*	-0,13ns							
Capacidad absorción agua 16 h (%)	-0,10ns	-0,13ns	0,23*	0,19ns	0,07ns	-0,03ns	0,18ns	-0,06ns	-0,18ns	0,03ns	0,65**						
Proporción de piel (%)	-0,02ns	-0,12ns	-0,11ns	-0,21*	-0,06ns	0,05ns	-0,02ns	-0,12ns	-0,47**	-0,31**	0,09ns	0,23*					
Inicio floración (días)	0,00ns	-0,27**	0,37**	-0,16ns	-0,28**	0,47**	0,09ns	0,02ns	-0,10ns	0,01ns	-0,13ns	-0,09ns	0,00ns				
Verdeo (días)	-0,12ns	-0,30**	0,40**	-0,13ns	-0,29**	0,39**	0,14ns	0,00ns	-0,16ns	0,07ns	-0,11ns	-0,07ns	-0,01ns	0,83**			
Final floración (días)	-0,01ns	-0,22*	0,37**	-0,15ns	-0,41**	0,40**	0,14ns	0,06ns	0,07ns	0,11ns	-0,08ns	-0,13ns	-0,18ns	0,65**	0,72**		
Recolección (días)	-0,01ns	-0,10ns	0,52**	0,06ns	-0,20ns	0,26**	0,34**	0,21*	0,12ns	0,31**	-0,03ns	0,03ns	-0,07ns	0,67**	0,75**	0,74**	

### 4.3.2 Identificación de los QTLs

En la tabla 4.4 se indican los principales QTLs encontrados para cada carácter y el grupo de ligamiento en el que se ubica cada uno, así como los marcadores o loci más estrechamente asociados junto con el correspondiente valor de LOD y la proporción de la varianza explicada por cada QTL. Para la mayor parte de los QTLs se encontró una asociación con al menos dos marcadores moleculares. Los valores de LOD variaron entre 3,0 del QTL IF<sub>4</sub> (inicio de floración situado en B8) y 10,6 del QTL CA4<sub>1</sub> (capacidad de absorción de agua a las 4 h situado en B3). Los valores de R<sup>2</sup> (porcentaje de la variación explicada) oscilaron entre el 10% encontrado para SWi<sub>3</sub>, SWi<sub>4</sub> y SW<sub>3</sub> (ancho de la semilla en B9 y B10 y peso de la semilla en B7 respectivamente) y el 36% para CA4<sub>1</sub> (capacidad de absorción de agua a las 4 h situado en B3).

Los resultados muestran que para algunos caracteres el porcentaje de la variación explicada por el conjunto de los correspondientes QTLs es muy alta. Por ejemplo, para el peso de la semilla los 5 QTLs localizados explican el 80% de la variación o para el carácter días a la recolección con 5 QTLs se llega a explicar el 87%. En cambio en caracteres como el ancho de la vaina o el número de semillas/vaina sólo se encontró un QTL que explica el 15% de la variación.

**Tabla 4.4.** Principales QTLs identificados en las RILs 'Xana'/Cornell 49242. Se indica la denominación de cada uno de los QTLs (con subíndices, en los caracteres para los que se ha localizado más de un QTL), el grupo de ligamiento en el que se localizan, los marcadores o loci más importantes asociados a él, el valor LOD y el porcentaje de variación explicada, R<sup>2</sup>. El marcador más estrechamente ligado aparece subrayado.

Carácter	QTL	GL	Marcadores o loci asociados	LOD	R <sup>2</sup> (%)
Longitud foliolo central	LL <sub>1</sub>	B8	<u>MCAGEAC</u> <sup>570</sup> / MCTGEAC <sup>391,49</sup> / MCAGEAC <sup>213</sup> / <u>MCATETC</u> <sup>92,28</sup>	4,0	17
	LL <sub>2</sub>	B9	<u>MCTAETA</u> <sup>61,94</sup> / MCATETA <sup>191,40</sup>	6,9	23
Ancho foliolo central	LW <sub>1</sub>	B1	<u>Fin</u>	7,4	29
	LW <sub>2</sub>	B7	<u>asp</u>	4,0	15
	LW <sub>3</sub>	B9	<u>MCTAETA</u> <sup>61,94</sup> / MCATETA <sup>191,40</sup>	5,4	21
Longitud vaina	PL <sub>1</sub>	B8	<u>MCAGEAC</u> <sup>213</sup>	3,8	14
	PL <sub>2</sub>	B8	<u>MCTGEAT</u> <sup>191,78</sup>	3,2	16
Ancho vaina	PW	B7	<u>SpJ / Pha / SpE / JO1263</u> <sup>218</sup> / MCTAEAT <sup>135</sup> / SZ04 <sup>525</sup>	4,5	15
Grueso vaina	PH <sub>1</sub>	B1	<u>Fin</u> / GAG(CAA) <sub>5</sub> <sup>909/935</sup>	3,3	13
	PH <sub>2</sub>	B2	<u>OP10</u> <sup>1600</sup>	3,6	13
	PH <sub>3</sub>	B8	MCTGEAG <sup>167,36</sup> / <u>MCATETC</u> <sup>121</sup> / MCTGEAT <sup>46,53</sup>	3,6	15
Nº semillas/vaina	SP	B1	<u>Fin</u> / GAG(CAA) <sub>5</sub> <sup>909/935</sup> / Bmd45 <sup>200/250</sup>	3,8	13
Longitud semilla	SL <sub>1</sub>	B2	<u>Sw13</u> <sup>690</sup>	3,2	12
	SL <sub>2</sub>	B3	MCATEAG <sup>166</sup> / MCATETA <sup>141,38</sup> / MCATETA <sup>142,54</sup> / <u>MCATETC</u> <sup>220,95</sup> MCATETA <sup>129,17</sup> / MCATEAG <sup>79,61</sup> / MCTGEAT <sup>55,40/55,70</sup>	5,2	12
	SL <sub>3</sub>	B6	MCTGEAC <sup>133,19</sup> / MCTGEAC <sup>115,62</sup> / MCTGEAC <sup>118,47</sup> / <u>ROC11</u> <sup>300</sup>	4,8	15
	SL <sub>4</sub>	B8	<u>MCTGEAT</u> <sup>191,78</sup>	3,4	20
	SL <sub>5</sub>	B10	<u>MCATETC</u> <sup>72,69</sup> / MCATETC <sup>73,56</sup>	3,3	14
Ancho semilla	SWi <sub>1</sub>	B6	MCTGEAC <sup>118,47</sup> / <u>ROC11</u> <sup>300</sup>	7,8	22
	SWi <sub>2</sub>	B8	MCTGEAT <sup>191,78</sup> / MCAGETC <sup>141</sup> / <u>(ACTG)</u> <sub>4</sub> <sup>850</sup> / (ACTG) <sub>4</sub> <sup>848</sup>	4,1	25
	SWi <sub>3</sub>	B9	MCTGEAG <sup>37,05</sup> / <u>(AC)</u> <sub>8</sub> YG <sup>694</sup>	3,6	10
	SWi <sub>4</sub>	B10	<u>MCATETC</u> <sup>240</sup> / MCATETC <sup>72,69</sup>	3,8	10
Grueso semilla	SH <sub>1</sub>	B3	<u>MCATEAG</u> <sup>166</sup>	4,5	14
	SH <sub>2</sub>	B7	<u>P / SpB</u>	3,5	12
Peso semilla	SW <sub>1</sub>	B6	MCTAEAT <sup>158,68</sup> / MCTGEAC <sup>133,19</sup> / <u>MCAGEAC</u> <sup>115,62</sup> / MCTGEAC <sup>118,47</sup>	6,4	18
	SW <sub>2</sub>	B7	SZ04 <sup>525</sup> / MCTGEAC <sup>276,38</sup> / MCTGEAT <sup>122,29</sup>	5,6	15
	SW <sub>3</sub>	B7	<u>(AC)</u> <sub>8</sub> YT <sup>1029</sup> / P	3,1	10
	SW <sub>4</sub>	B8	<u>MCTGEAT</u> <sup>191,78</sup>	5,0	22
	SW <sub>5</sub>	B8	MCTGEAG <sup>167,36</sup> / MCATETC <sup>121</sup> / MCTGEAT <sup>46,53</sup>	3,9	15
Absorción agua 4 h	CA4 <sub>1</sub>	B3	MCTAETA <sup>38,09</sup> / <u>SR20</u> <sup>400</sup>	10,6	36
	CA4 <sub>2</sub>	B6	MCTAETA <sup>54,46</sup> / MCATETC <sup>60,94</sup>	3,8	23
	CA4 <sub>3</sub>	B7	<u>asp</u> / MCAGEAC <sup>308</sup> / <u>SAS8</u> <sup>1550</sup>	4,4	19
Absorción agua 16 h	CA16 <sub>1</sub>	B3	MCTAETA <sup>38,09</sup> / SR20 <sup>400</sup>	3,7	16
	CA16 <sub>2</sub>	B8	MCTAETA <sup>92,12</sup> / MCATEG <sup>60,80</sup> / MCTGEAT <sup>148</sup> / <u>SBB14</u> <sup>1050/1150</sup>	3,8	15
Proporción de piel	PP	B7	BM185 <sup>112/124</sup> / MCTGEAC <sup>475,39</sup> / MCATETC <sup>139,14</sup> / (AC) <sub>8</sub> YT <sup>1029</sup> P / SpB / SpA / MCTAETA <sup>37,28</sup>	7,5	28
Inicio floración	IF <sub>1</sub>	B1	MCTAEAT <sup>124,03</sup> / <u>BM170</u> <sup>130</sup>	7,1	29
	IF <sub>2</sub>	B1	<u>BMD45</u> <sup>200/250</sup> / SpD	6,5	27
	IF <sub>3</sub>	B2	MCTGEAC <sup>102,63</sup> / <u>MCTGEAG</u> <sup>278,96</sup>	3,8	11
	IF <sub>4</sub>	B8	MCTGEAC <sup>391,49</sup> / <u>MCAGEAC</u> <sup>213</sup>	3,0	11
Verdeo	V <sub>1</sub>	B2	<u>Sw13</u> <sup>690</sup>	4,8	34
	V <sub>2</sub>	B2	MCAGEAC <sup>223</sup> / <u>MCTGEAG</u> <sup>88,08</sup> / OP10 <sup>1600</sup>	3,2	12
Final floración	FF <sub>1</sub>	B1	<u>Fin</u> / GAG(CAA) <sub>5</sub> <sup>909/935</sup>	10,2	29
	FF <sub>2</sub>	B2	MCAGEAC <sup>116</sup> / <u>MCTGEAC</u> <sup>102,63</sup> / MCTGEAG <sup>278,96</sup>	5,2	12
Recolección	R <sub>1</sub>	B1	<u>Fin</u> / GAG(CAA) <sub>5</sub> <sup>909/935</sup>	4,4	12
	R <sub>2</sub>	B2	<u>Sw13</u> <sup>690</sup>	3,8	24
	R <sub>3</sub>	B2	MCAGEAC <sup>116</sup> / MCTGEAC <sup>102,63</sup>	6,3	18
	R <sub>4</sub>	B6	<u>MCATEAG</u> <sup>145,17</sup>	4,1	11
	R <sub>5</sub>	B6	MCTGEAC <sup>115,62</sup> / <u>MCTGEAC</u> <sup>118,47</sup>	7,6	22

### **4.3.3 Contribución de los parentales en cada uno de los QTLs analizados**

Con objeto de establecer la contribución de cada parental (aumento o disminución del carácter cuantitativo) en cada uno de los QTLs, se estableció la comparación entre grupos de RILs en función del marcador más estrechamente ligado a cada carácter cuantitativo.

En la tabla 4.5 aparecen indicados los QTLs, el marcador al que están más estrechamente ligado, el genotipo que presentan los parentales para el marcador y el fenotipo para el carácter de las líneas recombinantes con el alelo igual al de 'Xana' o al de Cornell 49242.

**Tabla 4.5.** Comparación del fenotipo del alelo del marcador igual al de 'Xana' o igual al de Cornell 49242. Se indican los QTL analizados, el grupo de ligamiento en el que se localizan, el fenotipo de los parentales y el marcador más estrechamente ligado así como el fenotipo de las RILs atendiendo al genotipo de cada uno de los parentales. Se señala el resultado de la prueba *T de Student*: \*\* $p \leq 0,01$  \* $0,01 > p \geq 0,05$  ns  $p > 0,05$ .

Carácter	QTL	GL	Marcador	Fenotipo parentales		Fenotipo en RILs		<i>p</i>
				Xana	Cornell 49242	Alelo Xana	Alelo Cornell 49242	
Longitud foliolo central	LL1	B8	MCATETC <sup>92,28</sup>	10,9 ± 0,1	11 ± 0,2	11,4 ± 0,2	10,8 ± 0,1	**
	LL2	B9	MCTAETA <sup>61,94</sup>			10,7 ± 0,1	11,6 ± 0,1	**
Ancho foliolo central	LW1	B1	<i>Fin</i>	9,3 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8 ± 0,1	**
	LW2	B7	<i>J</i>			8,7 ± 0,1	8,2 ± 0,1	**
	LW3	B9	MCTAETA <sup>61,94</sup>			8,1 ± 0,1	8,8 ± 0,1	**
Longitud vaina	PL1	B8	MCAGEAC <sup>213</sup>	13,7 ± 0,2	8,3 ± 0,1	10,3 ± 0,2	9,6 ± 7,7	**
	PL2	B8	MCTGEAT <sup>191,78</sup>			9,8 ± 8,2	10,2 ± 0,2	ns
Ancho vaina	PW	B7	JO1263 <sup>218</sup>	14,4 ± 0,1	10,8 ± 0,1	12,2 ± 0,2	11,5 ± 0,1	**
Grueso vaina	PH1	B1	<i>Fin</i>	7,4 ± 0,2	6,7 ± 0,1	6,9 ± 0,1	6,5 ± 0,1	**
	PH2	B2	OG06 <sup>1100</sup>			6,4 ± 0,1	6,9 ± 0,1	**
	PH3	B8	MCATETC <sup>121</sup>			6,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1	**
Nº semillas/vaina	SP	B1	<i>Fin</i>	3 ± 0,1	5,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,2 ± 0,1	**
Longitud semilla	SL1	B2	Sw13 <sup>690</sup>	22,4 ± 0,2	9,6 ± 0,1	14,7 ± 0,2	13,7 ± 0,2	**
	SL2	B3	MCATETC <sup>220,95</sup>			14,9 ± 0,3	13,7 ± 0,2	**
	SL3	B6	ROC11 <sup>300</sup>			14,8 ± 0,2	13,5 ± 0,2	**
	SL4	B8	MCTGEAT <sup>191,78</sup>			13,9 ± 0,2	14,6 ± 0,3	**
	SL5	B10	MCATETC <sup>72,69</sup>			14,7 ± 0,2	13,8 ± 0,2	**
Ancho semilla	SWi1	B6	ROC11 <sup>300</sup>	9,5 ± 0,1	6,6 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,4 ± 0,1,	**
	SWi2	B8	(ACTG) <sub>4</sub> <sup>850</sup>			7,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	*
	SWi3	B9	(AC) <sub>8</sub> YG <sup>694</sup>			7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1	ns
	SWi4	B10	MCATETC <sup>240</sup>			7,8 ± 0,1	7,6 ± 0,1	ns
Grueso semilla	SH1	B3	MCATEAG <sup>166</sup>	7,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	6,2 ± 0,1	5,6 ± 0,1	**
	SH2	B7	<i>P</i>			6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	**
Peso semilla	SW1	B6	MCTGEAC <sup>115,62</sup>	8,5 ± 0,6	2,3 ± 0,1	5,2 ± 0,2	4,1 ± 0,1	**
	SW2	B7	MCTGEAC <sup>276,38</sup>			4,9 ± 0,2	4,2 ± 0,1	**
	SW3	B7	(AC) <sub>8</sub> YT <sup>1029</sup>			4,9 ± 0,2	4,4 ± 0,1	*
	SW4	B8	MCTGEAT <sup>191,78</sup>			4,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2	*
	SW5	B8	MCTGEAG <sup>167,36</sup>			4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,2	ns
Capacidad absorción agua 4 h	CA41	B3	SR20 <sup>400</sup>	103,5 ± 2,1	88,6 ± 2,1	96,4 ± 1,5	58,3 ± 4,7	**
	CA42	B6	MCTAETAT <sup>54,46</sup>			69,7 ± 5,3	82,6 ± 3,5	ns
	CA43	B7	SAS8 <sup>1500</sup>			68,1 ± 1,9	84,5 ± 3,6	**
Capacidad absorción agua 16 h	CA161	B3	MCTAETA <sup>38,09</sup>	124,4 ± 3,4	114,5 ± 1,8	116 ± 1,6	106,8 ± 1,7	**
	CA162	B8	SBB14 <sup>1050/1150</sup>			106,7 ± 2,2	115,7 ± 1,2	**
Proporción de piel	PP	B7	<i>P</i>	7,7 ± 0,2	8 ± 0,1	7,9 ± 0,1	8,9 ± 0,2	**
Inicio floración	IF1	B1	BM170 <sup>130</sup>	60,4 ± 0,8	57,4 ± 1,6	56,9 ± 1,4	61,3 ± 1,3	*
	IF2	B1	BMd45 <sup>200/250</sup>			56,7 ± 1,2	63,6 ± 1	**
	IF3	B2	MCTGEAG <sup>278,96</sup>			62,8 ± 1,4	58,9 ± 1	*
	IF4	B8	MCAGEAC <sup>213</sup>			63,2 ± 1,1	57,5 ± 0,9	**
Verdeo	V1	B2	Sw13 <sup>690</sup>	77,9 ± 2,6	77,6 ± 1	83,4 ± 1,2	77,7 ± 1	**
	V2	B2	MCTGEAG <sup>88,08</sup>			83,3 ± 1,3	78,2 ± 1,1	**
Final floración	FF1	B1	<i>Fin</i>	85,6 ± 2,6	78,9 ± 2,3	77,2 ± 1,3	88,9 ± 1,2	**
	FF2	B2	MCTGEAC <sup>102,63</sup>			89,1 ± 1,4	82,1 ± 1,5	**
Recolección	R1	B1	<i>Fin</i>	130,2 ± 8,9	103,6 ± 2,7	109,9 ± 1,4	118,3 ± 1,6	**
	R2	B2	Sw13 <sup>690</sup>			118,6 ± 1,8	111,7 ± 1,3	**
	R3	B2	MCAGEAC <sup>116</sup>			121,2 ± 1,7	111,2 ± 1,4	**
	R4	B6	MCATEAG <sup>145,17</sup>			109,6 ± 0,7	127,6 ± 1,3	ns
	R5	B6	MCTGEAC <sup>118,47</sup>			119,6 ± 1,9	112,1 ± 1,5	**

Los resultados mostraron diferencias significativas para la mayor parte de los caracteres analizados. Sólo en 6 casos, la comparación entre los dos grupos de líneas con respecto al marcador más estrechamente ligado no resultó significativa. Estos QTLs fueron: PL<sub>2</sub> (longitud de la vaina en el grupo de ligamiento B8), SWi<sub>3</sub> y SWi<sub>4</sub> (ancho de la semilla en B9 y en B10), SW<sub>5</sub> (peso de la semilla en B8), CA4<sub>2</sub> (capacidad de absorción de agua a las 4 h en B6) y R<sub>4</sub> (recolección en B6).

Por otro lado, se observa que en la mayor parte de los casos la media del carácter es más elevada en el grupo de líneas con el alelo del marcador más estrechamente ligado igual al del parental que presenta el valor más elevado de dicho carácter. En 12 QTLs (LL<sub>1</sub>, LW<sub>3</sub>, PH<sub>2</sub>, SL<sub>4</sub>, SWi<sub>2</sub>, SW<sub>4</sub>, CA4<sub>3</sub>, CA16<sub>2</sub>, IF<sub>1</sub>, IF<sub>2</sub>, FF<sub>1</sub> y R<sub>1</sub>) ocurre lo contrario. Así por ejemplo, en el QTL SL<sub>4</sub> (longitud de la semilla situado en B8) el valor medio en las RILs es más alto en aquellas líneas que tienen el alelo del marcador más estrechamente ligado, como Cornell 49242, en lugar de las que lo tienen como 'Xana'.

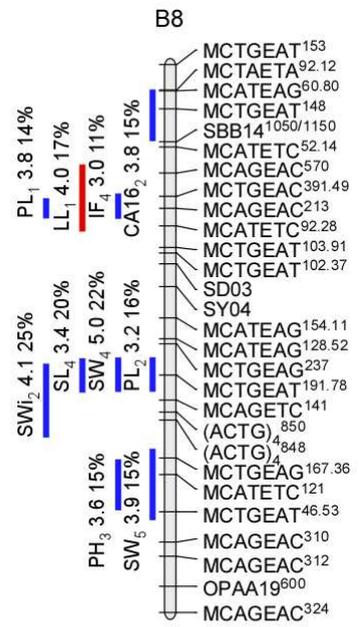
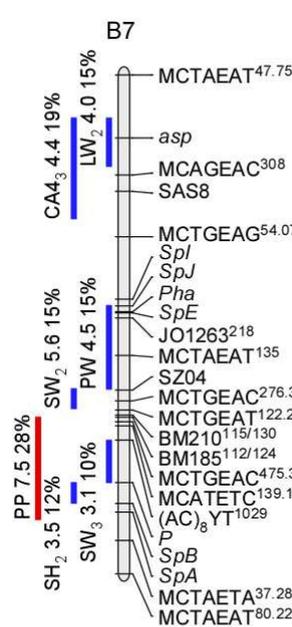
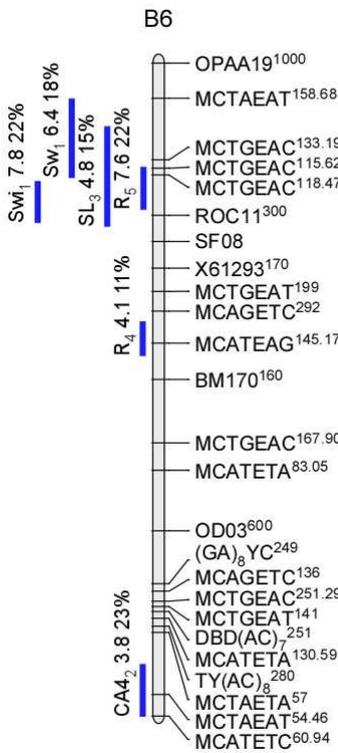
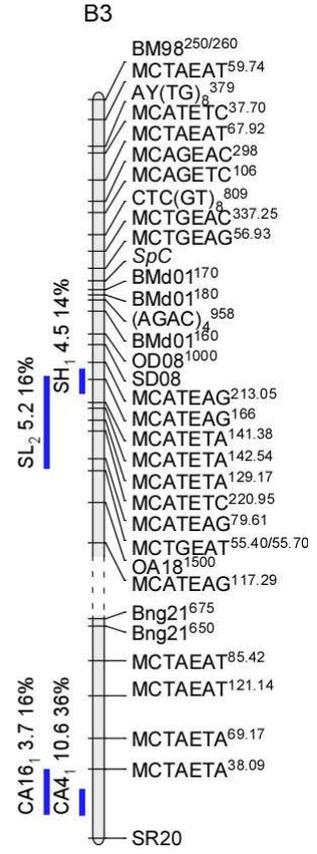
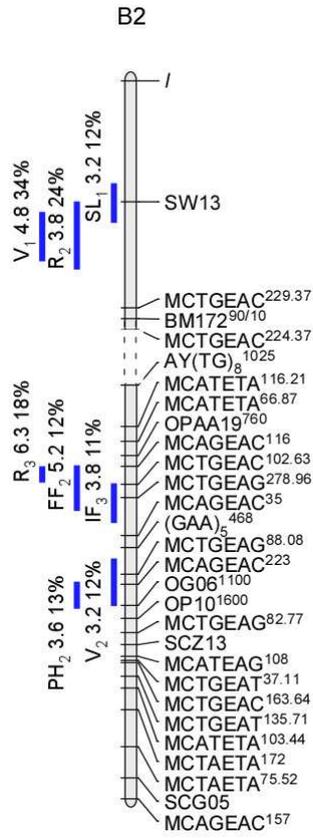
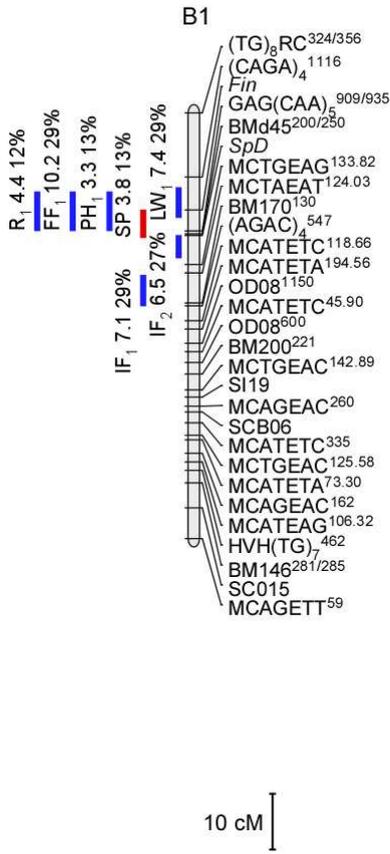
#### **4.3.4 Localización de los QTLs en el mapa genético**

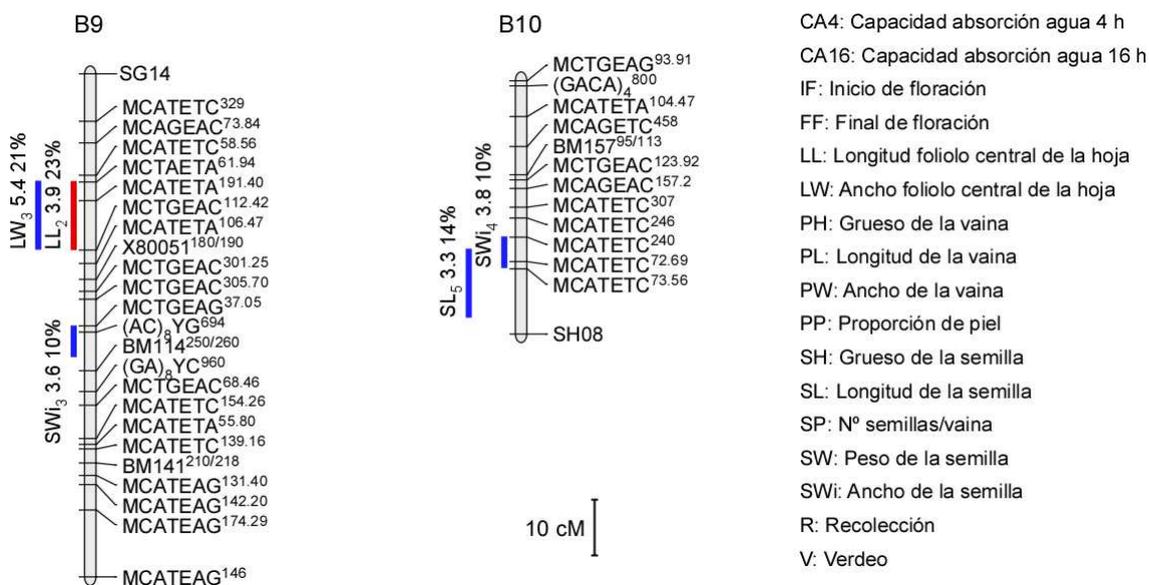
La tabla 4.6 muestra un resumen de los loci identificados por grupo de ligamiento. En los grupos B4, B5 y B11 no se localizó ningún QTL para los caracteres estudiados. En el resto de grupos de ligamiento, se localizaron un total de 47 QTLs. El grupo de ligamiento que mayor número de QTLs presenta es el B8 con 10, seguido del B2 con 8 y B1 y B7 con 7 QTLs. En B1, destaca la región en torno al gen *Fin*, por el elevado grado de saturación que presenta. El resto de caracteres cuantitativos se distribuyen en los grupos de ligamiento B6, con 6 QTLs, B3 con 4, B9 con 3 y B10 con 2.

**Tabla 4.6.** QTLs identificados en cada grupo de ligamiento para los distintos caracteres analizados. Se indican los grupos de ligamiento en los que se localizan los QTLs, el número total de QTLs encontrados para cada carácter y el porcentaje de la variación explicada por el total de los QTLs detectados para cada carácter ( $R^2$ ).

Carácter	QTL	Grupo ligamiento											Total	$R^2$ (%)
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11		
Longitud foliolo central (cm)	LL	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	40
Ancho foliolo central (cm)	LW	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	3	65
Longitud vaina (cm)	PL	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	30	
Ancho vaina (mm)	PW	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	15	
Grueso vaina (mm)	PH	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	3	41	
Nº semillas/vaina	SP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	13	
Longitud semilla (mm)	SL	-	1	1	-	-	1	-	1	-	1	5	73	
Ancho semilla (mm)	SWi	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	4	67	
Grueso semilla (mm)	SH	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	26	
Peso semilla (g)	SW	-	-	-	-	-	1	2	2	-	-	5	80	
Capacidad absorción agua 4 h (%)	CA4	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	3	78	
Capacidad absorción agua 16 h (%)	CA16	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	2	31	
Proporción de piel (%)	PP	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	28	
Inicio floración (días)	IF	2	1	-	-	-	-	-	1	-	-	4	78	
Verdeo (días)	V	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	46	
Final floración (días)	FF	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	41	
Recolección (días)	R	1	2	-	-	-	2	-	-	-	-	5	87	
<b>Total</b>		<b>7</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>47</b>	

En la figura 4.6 se muestra el mapa genético desarrollado a partir de la población de líneas recombinantes derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242. Se representan con una barra vertical los loci encontrados para los caracteres analizados (QTLs). En cada QTL, se indica el valor de LOD y el porcentaje de variación explicada ( $R^2$ ).





**Figura 4.6.** Mapa genético desarrollado a partir de la población de líneas recombinantes derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242. Cada QTL se representa con una barra vertical, indicando el valor de la LOD y el porcentaje de variación explicada ( $R^2$ ). En azul, los QTLs en los que la contribución del carácter es superior por parte del parental 'Xana'; en rojo los QTLs en los que es superior por parte del parental Cornell 49242. Si se han localizado varios QTLs para un carácter determinado, se indican con subíndices.

## 4.4. Discusión

Este trabajo se ha desarrollado sobre una población de líneas recombinantes derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242. Los parentales utilizados, además de pertenecer a acervos genéticos distintos, presentan características muy diferentes como ha quedado reflejado en las diferencias significativas encontradas (véase tabla 4.2). La variedad 'Xana' presenta un hábito de crecimiento determinado y un fenotipo de semilla dentro del tipo Fabada, la semilla más grande descrita en la especie (Voyses, 2000). La variedad Cornell 49242 es una línea reconocida internacionalmente que forma parte del juego de variedades diferenciales comúnmente utilizadas para la identificación de razas de antracnosis (Pastor-Corrales, 1991). Esta línea presenta un hábito de crecimiento indeterminado rastro y una semilla que pertenece al tipo comercial Black turtle, según Santalla *et al.* (2001), de las más pequeñas descritas en la especie.

El mapa genético 'Xana'/Cornell 49242 desarrollado en la población de RILs destaca por ser un mapa relativamente saturado de marcadores moleculares. La distancia media entre loci es de 3,54 cM. Por otra parte, la población de mapeo está formada por líneas recombinantes, lo que permitió repetir las evaluaciones y disponer de una caracterización muy fiable de cada línea. Estas dos particularidades ofrecieron la posibilidad de identificar regiones asociadas a caracteres cuantitativos con relativa precisión (la mayoría de los QTLs se asociaron a varios marcadores). Para la localización de los loci cuantitativos se consideraron unas condiciones de mapeo muy restrictivas; el análisis CIM (*composite interval mapping*) se llevó a cabo grupo de ligamiento a grupo de ligamiento, en un intervalo cromosómico de 2 cM, LOD  $\geq 3$  y con un porcentaje de variación explicada,  $R^2 \geq 10\%$ . El análisis CIM es el más utilizado en los últimos años (Park *et al.*, 2000; Ender y Kelly, 2005; Blair *et al.*, 2006b) ya que resulta más fiable que los usados anteriormente. En la década de los 90, la localización de QTLs se realizaba mediante el análisis IM (*interval mapping*) que proporcionaba posiciones menos precisas (Koinange *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1998). En cuanto a las condiciones de mapeo, se han descrito otros trabajos de localización de QTLs en judía que emplean unas condiciones menos limitantes. Son los casos de Frei *et al.* (2005) que utilizan para el análisis CIM un intervalo cromosómico de 10 cM y un valor de LOD  $\geq 2,5$  y Tar'an *et al.* (2002) que se basa en una LOD  $\geq 2,5$  como único condicionante para localizar los loci para caracteres cuantitativos.

En total se localizaron 47 QTLs para los 17 caracteres cuantitativos analizados, situados en 8 grupos de ligamiento. Aparecen regiones cromosómicas altamente saturadas como: el entorno del gen *fin* en el grupo de ligamiento B1, un extremo del grupo de ligamiento B6 y la mayor parte de los grupos de ligamiento B7 y B8. El número de QTLs identificados por

carácter osciló entre 1 y 5 y la contribución a la variación máxima encontrada por QTL ( $R^2$ ) fue del 36% (CA4<sub>1</sub>) como se observa en la tabla 4.4. Los menores valores del porcentaje de la variación explicada por el total de los QTLs detectados para cada carácter (ver tabla 4.6) fueron del 15% y del 13% para el QTL PW (ancho de la vaina en B7) y el QTL SP (número de semillas/vaina en B1), respectivamente. Se encontró al menos un QTL para todos los caracteres analizados, incluso para aquellos en los que las diferencias entre los parentales no fueron significativas (longitud del foliolo central de la hoja, inicio y final de floración y verdeo), lo que sugiere la implicación de diferentes QTLs para estos caracteres en los parentales. Obviamente en estos casos, el rango de la variación que presentan las RILs es mayor que la diferencia que presentan los parentales. La recombinación genera líneas con nuevas combinaciones de QTLs para un carácter que se traducen en fenotipos diferentes a los de los padres.

Por otro lado, se observa que existe una tendencia a que se localicen juntos los QTLs de caracteres correlacionados (ver tabla 4.3). Esto, puede deberse a que el mismo gen actúe pleiotrópicamente sobre esos caracteres o puede ser resultado del propio ligamiento. Así por ejemplo, para los caracteres inicio y final de floración, verdeo y recolección, que están altamente correlacionados, se encontraron varias regiones donde se localizan grupos de QTLs de estos caracteres fenológicos: en el grupo de ligamiento B1, en el entorno del gen *fin*, aparecen localizados los QTLs FF<sub>1</sub> (final de floración) y R<sub>1</sub> (recolección) y en una región próxima se ubican los QTLs IF<sub>1</sub> e IF<sub>2</sub> (inicio de floración). En B2, se encuentran otros dos grupos de QTLs: R<sub>3</sub> (recolección), FF<sub>2</sub> (final de floración) e IF<sub>3</sub> (inicio de floración) en la región del marcador AFLP MCTGEAC<sup>278,96</sup> y en el entorno del SCAR SW13 los QTLs V<sub>1</sub> (verdeo) y R<sub>2</sub> (recolección). También, las correlaciones encontradas en los caracteres longitud, ancho, grueso y peso de la semilla, se corresponden con los grupos de QTLs localizados para estos caracteres; en B6 en el entorno del marcador MCTGEAC<sup>118,47</sup>: SW<sub>1</sub> (peso de la semilla), SWi<sub>1</sub> (grueso) y SL<sub>3</sub> (longitud). En B3 en las proximidades de MCATEAG<sup>166</sup>, SL<sub>2</sub> (longitud de la semilla) y SH<sub>1</sub> (grueso). En B7 los QTLs SH<sub>2</sub> (grueso) y SW<sub>3</sub> (peso de la semilla) cercanos a MCATETC<sup>139,19</sup>. En B8 SWi<sub>2</sub> (ancho), SL<sub>4</sub> (longitud) y SW<sub>4</sub> (peso de la semilla) en las proximidades de MCTGEAT<sup>191,78</sup> y en B10 SL<sub>5</sub> (longitud) y SWi<sub>4</sub> (ancho) en el entorno de MCATETC<sup>72,69</sup>.

En cuanto a las relaciones encontradas entre los QTLs y los marcadores más estrechamente ligados, hay que destacar, que se han identificado 6 QTLs, con un valor de LOD > 3, entre los que la comparación entre grupos con respecto a este marcador no ha resultado significativa (ver tabla 4.5). Por tanto, la utilidad del marcador para hacer selección asistida no resultaría efectiva. Además, en 12 QTLs (LL<sub>1</sub>, LW<sub>3</sub>, PH<sub>2</sub>, SL<sub>4</sub>, SWi<sub>2</sub>, SW<sub>4</sub>, CA4<sub>3</sub>, CA16<sub>2</sub>, IF<sub>1</sub>, IF<sub>2</sub>, FF<sub>1</sub> y R<sub>1</sub>) se observa que la media del carácter es más elevada en el grupo de líneas con el alelo del marcador más estrechamente ligado igual al del parental que

presenta el valor menos elevado de dicho carácter. Por ejemplo, en la tabla 4.5 se observa que en el QTL SW<sub>4</sub> (peso de la semilla localizado en B8) el valor medio en las RILs es más alto en aquellas líneas que tienen el alelo del marcador más estrechamente ligado (MCTGEAT<sup>191,78</sup>) como Cornell 49242, en lugar de las que lo tienen como 'Xana' (4,89 frente a 4,32). Este aspecto es algo que debe ser considerado para la posible utilización de cada uno de los marcadores en selección asistida.

En la revisión de los trabajos realizados en esta especie, se pone de manifiesto que los mismos caracteres analizados en diferentes poblaciones se sitúan en grupos de ligamiento distintos, aunque en varios casos, algunos de los QTLs localizados para un carácter determinado aparecen en los mismos grupos de ligamiento como se observa en la tabla 4.7. Hay que tener presente, que los resultados de este trabajo muestran la localización de QTLs en la población de líneas recombinantes derivadas del cruzamiento 'Xana' x Cornell 49242.

**Tabla 4.7.** Comparación de los resultados obtenidos en la localización de QTLs entre distintos autores y el presente trabajo.

Referencia	Nº semillas / vaina	Longitud semilla	Ancho semilla	Grueso semilla	Peso semilla	Final floración	Recolección
Presente trabajo	B1	B2, B3, B6, B8, B10	B6, B8, B9, B10	B3, B7	B6, B7, B8	B1, B2	B1, B2, B6
Tar'an <i>et al.</i> , 2002	B5	-	-	-	B4, B11	B1, B2, B6, B9, B11	B9, B10
Park <i>et al.</i> , 2000	-	B2, B3, B4, B8, B11	B4, B6	B2, B4, B5, B6, B7	-	-	-
Blair <i>et al.</i> , 2006	-	-	-	-	B2, B3, B6, B7, B8, B9, B10, B11	-	B1, B5, B6, B7
Tsai <i>et al.</i> , 1998	-	-	-	-	B1, B2, B5, B9	-	-
Beattie A.D. <i>et al.</i> , 2001	-	-	-	-	-	-	B4, B6, B8

Además, Koinange *et al.* (1996) encuentran una asociación entre el gen *Fin/fin* (hábito de crecimiento indeterminado/determinado, respectivamente), y el periodo de floración. En este trabajo, en el entorno del gen *Fin/fin*, aparecen localizados los QTLs FF<sub>1</sub> (final de floración) y R<sub>1</sub> (recolección) y, en una región próxima los QTLs IF<sub>1</sub> e IF<sub>2</sub> (inicio de floración). Las asociaciones encontradas entre estos QTLs y el marcador más estrechamente ligado al gen *fin* resultaron significativas. Estos resultados son coherentes, si se tiene en cuenta que el hábito de crecimiento condiciona la duración del ciclo de cultivo en judía; los hábitos determinados presentan ciclos de cultivo más cortos (son plantas más precoces) que los indeterminados. Por otro lado, en el grupo de ligamiento B7 se ha descrito una asociación entre el locus de la faseolina y el tamaño de la semilla (Koinange *et al.* 1996; Park *et al.* 2000). En este trabajo los resultados no muestran dicha asociación, aunque en el grupo de ligamiento B7, se localizan dos QTLs, SW<sub>3</sub> y SH<sub>2</sub> implicados en el tamaño de la semilla, pero

en el entorno de las proteínas *SpB*, *SpA* y el locus *P* (presencia/ausencia de color en la semilla).

Una de las aplicaciones más inmediatas de la localización de QTLs en los mapas genéticos es su utilización en la selección asistida por marcadores moleculares o selección indirecta. Sin embargo, esta aplicación puede ser incierta dado que depende de variables como el número de QTLs identificados para un carácter dado, el efecto de cada QTL sobre el carácter, el tamaño de la región cromosómica implicada, la disponibilidad de varios marcadores polimórficos asociados al QTL y la posición de esos marcadores. Por ejemplo, para el carácter peso de la semilla, de gran importancia en la mejora de la clase comercial Fabada, se han identificado cinco QTLs en tres grupos de ligamiento cuya contribución a la variación oscila entre el 10% y el 22%. La aplicación de la selección asistida por marcadores para este carácter requeriría el análisis de esas cinco regiones o al menos de aquellas que más peso tienen sobre el carácter para poder influir significativamente sobre él. Además, en cada región podría ser conveniente analizar varios marcadores a fin de identificar posibles recombinaciones que alterasen el efecto del QTL sobre el carácter. Todo esto implica que su aplicación en mejora presenta una mayor complejidad que para caracteres cualitativos. No obstante, en algunos casos particulares donde el número de QTLs es limitado y con importante efecto sobre el carácter su selección indirecta puede resultar interesante para enriquecer las poblaciones sometidas a selección.

Por otra parte, existe el inconveniente de que la mayor parte de los marcadores que integran el mapa genético son AFLPs. Este tipo de marcadores resultan muy útiles para una rápida elaboración de estos mapas, dado que permiten obtener numerosos marcadores polimórficos en cada reacción, pero son difíciles de aplicar en un proceso de selección asistida ya que su obtención resulta muy tediosa y es difícil identificar el fragmento específico. No obstante, podría considerarse la posibilidad de transformar este tipo de marcadores AFLPs en marcadores más fáciles de utilizar en la práctica. Además, este trabajo aporta asociaciones entre marcadores no AFLPs y caracteres cuantitativos. Un ejemplo es la región en torno al marcador ROC11<sup>300</sup> en el grupo de ligamiento B6 en la que aparecen una serie de QTLs para el tamaño de la semilla. Este marcador está estrechamente ligado con el gen *bc-3* implicado en la resistencia a BCMV y BCMNV (Johnson et al., 1997) y ha sido utilizado para la incorporación de este gen de resistencia en faba Granja (líneas A2418 y A2806; véase apartado 3 de esta memoria). En este programa de mejora se ha constatado la dificultad de recuperar tamaños de semilla similares al del parental recurrente 'Andecha', lo que resulta coherente con la asociación detectada en este trabajo, de dicho marcador con el tamaño de semilla.



## **5.\_ Conclusiones generales**

---



## Conclusiones generales

- La caracterización en base a 29 descriptores morfológicos y a 11 marcadores moleculares mostró la amplia diversidad genética presente en la CN-CRF.

- Se han identificado 73 fenotipos diferentes de semilla en la CN-CRF entre los cuales, 37 pertenecen a clases comerciales establecidas por otros autores y 36 a clases no descritas previamente.

- El contenido en información polimórfica (PIC) fue muy elevado para los 11 marcadores moleculares analizados.

- Tanto el análisis de componentes principales como el dendrograma elaborado a partir de los datos moleculares, revelaron la existencia de dos grandes grupos de germoplasma que se corresponden con los acervos genéticos andino y mesoamericano descritos en la especie. Así mismo, los resultados pusieron de manifiesto la existencia de 21 entradas con una posición intermedia que probablemente procedan de hibridaciones entre materiales de ambos grupos.

- La caracterización de la CN-CRF desde diferentes enfoques sugiere que existen algunas entradas muy similares en este juego de entradas, cuya presencia podría ser reducida. Así mismo, la mejora de esta colección nuclear podría implicar la incorporación de entradas recolectadas en áreas geográficas pobremente representadas como las comunidades autónomas de Cataluña, Murcia, Canarias, Extremadura y Andalucía.

- Los resultados de la evaluación en campo de las 14 líneas tipo faba Granja desarrolladas mediante diferentes programas de mejora genética, han revelado una gran similitud dentro de los dos grupos determinadas/indeterminadas. Las pequeñas diferencias intragrupo pueden deberse a restos del genoma del parental donante, ligados o no a los genes introducidos, que no fueron eliminados en el proceso de mejora.

- El fenotipo de estas 14 líneas, encaja plenamente dentro del tipo comercial Fabada, es decir, su semilla es blanca, oblonga y muy grande. Las diferencias encontradas entre líneas, que pueden calificarse como ventajas y desventajas, ofrecen la oportunidad de seleccionar aquellas que más se ajusten a los intereses del sector.

- Utilizando un mapa genético desarrollado en las RILs 'Xana'/Cornell 49242, se han localizado 47 QTLs vinculados a 10 caracteres morfológicos, 4 caracteres fenológicos y 3 caracteres de calidad. La mayor parte de estos caracteres (10) no habían sido previamente incluidos en un mapa genético.

- La posición relativa de estos QTLs no coincide con la descrita por otros autores que analizan los mismos caracteres, lo que puede ser debido tanto al empleo de poblaciones de mapeo diferentes como a la menor densidad de los mapas utilizados por estos autores.

- La localización de estos QTLs en el mapa genético permitirá profundizar en el conocimiento del control genético de caracteres de gran interés agronómico y ofrece la posibilidad de realizar una selección asistida por marcadores moleculares.

## **6.\_ Referencias**

---



## Referencias

- Adam-Blondon A.F., Sévignac M., Bannerot H., Dron M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose. *Theor Appl Genet* 88: 865-870.
- Anderson J.A., Churchill G.A., Autrique J.E., Tanksley S.D., Sorrells M.E. 1993. Optimising parental selection for genetic linkage. *Genome* 36: 181-186.
- Asensio C., Montoya J.L., Alonso J. 1990. Judías de Castilla y León. Colección Monográfica INIA N° 75. INIA, Madrid. 47 pp.
- Bassett M.J. 2004. List of genes - *Phaseolus vulgaris* L. *Annu Rep Bean Improv Coop* 47: 1-24.
- Beattie A.D., Larsen J., Michaels T.E., Pauls K.P. 2003. Mapping quantitative trait loci for a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ideotype. *Genome* 46: 411-422.
- Beebe S.E., Skroch P.W., Tohme J., Duque M.C., Pedraza F., Nienhuis J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle american origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci* 40: 264-273.
- Blair M.W., Pedraza F., Buendía H.F., Gaitán-Solís E., Beebe S.E., Gepts P., Tohme J. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 107: 1362-1374.
- Blair M.W., Giraldo M.C., Buendía H.F., Tovar E., Duque M.C., Beebe S.E. 2006a. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 113: 100-109.
- Blair M.W., Iriarte G., Beebe S.E. 2006b. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean x wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theor Appl Genet* 112: 1149-1163.
- Bresani R., Navarrete D.A., García-Soto A., Elías L. 1988. Culinary practices and consumption characteristics common bean at the rural home level. *Arch Latinoam Nutr* 38: 925-932.
- Broughton W.J., Hernández G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.

- Brown A.H.D. 1995. The core collections at the crossroads. En: Core collections of plant genetic resources. T. Hodgkin, A.H.D. Brown, Th.J.L. van Hintum, E.A.V. Morales. Eds: John Wiley and Sons, United Kingdom. 3-19.
- Campa A. 2006. Aplicación de marcadores moleculares en la gestión de la diversidad genética y en el análisis de la resistencia a antracnosis en judía. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 180 pp.
- Campa A., Pérez-Vega E., Giraldez R., Ferreira J.J. 2006. Diversidad genética conservada en la colección de judías del SERIDA basada en el análisis de marcadores moleculares. Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español. II Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas. 247-254.
- Casañas F., Pujolá M., Bosch LI., Sánchez E., Nuez F. 2002. Chemical basis for the low sensory perception on the ganxet bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coat. *J Sci Food Agr* 82: 1282-1286.
- Casquero P.A. 1997. Comportamiento agronómico, variabilidad genética y relaciones taxonómicas de variedades de alubia (*Phaseolus vulgaris* L.) de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 274 pp.
- Castellanos J., Guzmán-Maldonado H. 1995. Effects of hardshell character on cooking time of common beans grown in the semiarid highlands of Mexico. *J Sci Food Agr* 69: 437-443.
- Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Cubero J.L., Nadal S., Moreno M.T. 2006. Recursos Fitogenéticos. Editorial Agrícola Española S.A. (MAPA). 190 pp.
- De la Rosa L., Lázaro A., Varela F. 2000. Racionalización de la colección española de *Phaseolus vulgaris* L. En: II Seminario de judías de la Península Ibérica. I Actas de la Asociación Española de Leguminosas. 55-62.
- De la Rosa L., Martín I., Varela F., De la Cuadra C. 2005. Genetic diversity in Spanish grain legumes collections. *Grain Legumes* 42: 10-11.

- Debouck D., Hidalgo R. 1985. Morfología de la planta del frijol común. En: Frijol: Investigación y producción. Eds: M. López, F. Fernández, A. van Schoohoven. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 7-60.
- Debouck D.G. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. En: Common bean improvement in the twenty-first century. Eds: S.P. Singh. 25-52.
- Díaz L.M., Blair M.W. 2006. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 144: 143-154.
- Doyle J.J., Doyle L.H. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Drijfhout E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* L. and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding resistance. Centre for Agriculture Publishing and documentation, Wageningen, Netherlands. *Agri Res Rept* 872: 1-98.
- Duran L.A., Blair M.W., Giraldo M.C., Macchiavelli R., Prophete E., Nin J.C., Beaver J.S. 2005. Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean. *Crop Sci* 45: 1320-1328.
- Elía M., Moralejo M., Rodríguez-Quijano M., Molina-Cano J.L. 2004. Spanish spelt: a separate gene pool within the spelt germplasm. *Plant Breeding* 123: 297-299.
- Elías L.G., García-Soto A., Bressani R. 1986. Métodos para establecer la calidad tecnológica y nutricional del frijol *Phaseolus vulgaris* L. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Guatemala. Centro América. 42 pp.
- Ender M., Kelly J.D. 2005. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. *Crop Sci* 45: 2482-2490.
- Esquinas-Alcázar J.T. 1983. Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro. INIA, Madrid, 44 pp.
- Fehr W.R. 1987. Principles of cultivar development: theory and technique. Macmillan Publishing Company. New York. 536 pp.
- Ferreira J.J., Álvarez E., Fueyo M.A., Roca A., Giraldez R. 2000. Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. *Euphytica* 113: 259-263.

- Ferreira J.J., Cerezo P., González A.J. 2002. Evaluación de germoplasma local de *Phaseolus* spp. frente a cinco razas de antracnosis aisladas en el norte de España. II Congreso Mejora Genética de Plantas. Actas de Horticultura 34: 357-363.
- Ferreira J.J., Campa A., Pérez-Vega E. 2005. Conservación y utilización de variedades tradicionales de *faba* en Asturias: Colección Activa de Judías del Principado de Asturias. Ediciones SERIDA – KRK. 91 pp.
- Ferreira J.J., Pérez-Vega E., Campa A. 2007. Nuevas variedades de judía tipo faba Granja desarrolladas en el SERIDA. Resultados de las evaluaciones morfológicas, agronómicas y de calidad. Ediciones SERIDA – KRK. 59 pp.
- Ferreira J.J., Pérez-Vega E., Campa A, Giraldez R. 2008. Reaction of a bean germplasm collection against five races of *Colletotrichum lindemuthianum* identified in northern Spain and implications for breeding. *Plant Dis*. En prensa.
- Frankel O.H. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. En: Genetic Manipulation: impact on man and society. Eds: W. Arber, K. Llimensee, W.J. Peacock, P. Starlinger. Cambridge University Press. Cambridge. 161-170.
- Fraser R.S. 1992. The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* 63: 175-192.
- Frei A., Blair W. Cardona C., Beede S.E., Gu H., Dorn S. 2005. QTL mapping of resistance to *Thrips palmi* karny in common bean. *Crop Sci* 45: 379-387.
- Freyre R., Skroch P.W., Geffroy V., Adam-Blondon A.F., Shirmohamadali A., Jonson W.C., Llica V., Nodari R.O., Pereira P.A., Tsai S.M., Tohme J., Dron M., Nienhuis J., Vallejos C.E., Gepts P. 1998. Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97: 847-856.
- Freytag G.F., Debouck D.G. 2002. Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae-Papilionoidae*) in North America, Mexico and Central America. En: Botanical Miscellany 23. Eds: SIDA. 298 pp.
- Fueyo M.A. 2004. Producción de judías de calidad. Ediciones: SERIDA – KRK. 483 pp.
- García-Más J., Graciano E., Aranzana M.J., Monforte A., Oliver M., Ballester J., Viruel M.A., Arús P. 2000. Marcadores de ADN: conceptos, tipos, protocolos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Eds: F. Nuez, J.M. Carrillo. Editorial UPV. 91-151 pp.

- Gepts P., Bliss F.A. 1985. F<sub>1</sub> hybrid weakness in the common bean: differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated bean germplasm. *J Hered* 76: 447-450.
- Gepts P., Osborn T.C., Rashka K., Bliss F.A. 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Evidence for multiple centers of domestication. *Econ Bot* 40 (4): 451-468.
- Gepts P. 1988. Genetic resources of Phaseolus beans. Eds. P. Gepts. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 375-391.
- Gepts P., Bliss F.A. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ Bot* 42(1): 86-104.
- Gepts P. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* 44(1): 50-60.
- Gepts P., Debouck D.G. 1991. Origin, domestication, and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Common beans: research for crop improvement. Eds: A. van Schoonhoven y O. Voysest. Wallingford y Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 7-53.
- Gonçalves-Vidigal M.C., Silva C.R., Vidigal Filho P.S., Poletine J.P. 2005. Characterization of the anthracnose resistance gene in common bean cultivar Michelite. *Annu Rep Bean Improv Coop* 48: 78-79.
- Guzmán-Maldonado H., Jacinto-Hernández C., Castellanos J. 1995. Manual de métodos para determinar características de calidad en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Campo Experimental Bajío, Celaya México. 77 pp.
- Hall R., Nasser L.C.B. 1996. Practice and precept in cultural management of bean. *Can J Plant Pathol* 18: 176-185.
- IBPGR. 1982. Descriptors for *Phaseolus vulgaris* L. IBPGR, Roma, Italia. 32 pp.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223-270.
- Jacinto H.C., Fernández H.P. 1993. Efecto de las heladas sobre factores nutrimentales y de calidad de frijol. *Rev Fitotec Mex* 16: 91-101.

- Jacinto H.C., Hernández-Sánchez H., Azpíroz-Rivero S., Acosta-Gallegos J., Bernal-Lugo I. 2002. Characterization of a common bean population of imbred lines regarding cooking quality and some nutritional components. *Agroscience* 36: 451-459.
- Jackson, G.M., Varriano-Marston E. 1981. Hard-to-cook phenomenon in beans: Effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J Food Sci* 46: 709-803.
- Johansen I.E., Lund O.S., Hjulsager C.K., Laursen J. 2001. Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in gene for cistron correspondence between host and virus. *J Virol* 75: 6609-6614.
- Johns A.M, Skroch P.W., Nienhuis J., Hinrichsen P., Bascur G., Muñoz-Schick C. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and Morphological data. *Crop Sci* 37: 605-613.
- Johnson W.C., Guzman P., Mandala D., Mkandawire A.B.C., Temple S., Gilbertson R.L., Gepts P. 1997. Molecular tagging of the *bc-3* for introgression into Andean common bean. *Crop Sci* 37: 248-254.
- Jung G., Skroch P.W., Nienhuis J., Coyne D.P., Arnaud-Santana E., Ariyaratne H.M., Marita J.M. 1999. Confirmation of QTL associated with common bacterial blight resistance in four different genetic backgrounds in common bean. *Crop Sci* 39: 1448-1455.
- Kameswara N.R., Hanson J., Dulloo M.E., Ghosh K., Nowell D., Larinde M. 2006. Manual of seed handling in Genebanks. Handbooks for Genebanks nº 8. Bioversity International. Rome, Italy. 147 pp.
- Kelly J.D., Afanador L., Haley S.D. 1995. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. *Euphytica* 82: 207-212.
- Kelly J.D., Gepts P., Miklas P.N., Coyne D.P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular-marker assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crop Res* 82: 135-154.
- Kelly J.D., Vallejo V.A. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *Hortscience* 39 (6): 1196-1207.
- Koenig R., Gepts P. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centres of genetic diversity. *Theor Appl Genet* 78: 809-817.

- Koinange E.M.K., Gepts P. 1992. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. *J Hered* 83: 135-139.
- Koinange E.M.K., Singh S.P., Gepts P. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Sci* 36: 1037-1045.
- Kolkman J.M., Kelly J.D. 2003. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. *Crop Sci* 43: 539-548.
- Krista C., Dessert S., Bliss F. Genetic improvement of food quality factors. 1994. In: Common Beans Research for Crop Improvement. Eds: A. van Schoohoven and O. Voysest. CAB International in association with CIAT. U.K. 649-678.
- Melotto M., Afanador L., Kelly J. D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. *Genome* 39: 1216-1219.
- Méndez de Vigo B., Rodríguez-Suárez C., Pañeda A., Giraldez R., Ferreira J.J. 2002. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. *Annu Rep Bean Improv Coop* 45: 116-117.
- Méndez-Vigo B., Rodríguez-Suárez C., Pañeda A., Ferreira J.J., Giraldez R. 2005. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. *Euphytica* 141: 237-245.
- Miklas P.N., Delorme R., Stone V., Daly M.J., Stavely J.R., Steadman J.R., Basset M.J., Beaver J.S. 2000. Bacterial, fungal, virus disease loci mapped in a recombinant inbred common bean population ("Dorado/XAN 176"). *J Am Soc Hortic Sci* 125 (2): 476-481.
- Miklas P.N., Johnson W.C., Delorme R., Gepts P. 2001. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. *Crop Sci* 43: 39-40.
- Miklas P.N., Coyne D.P., Grafton K.F., Mutlu N., Reiser J., Lindgren D.T., Singh S.P. 2003. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana nº 5. *Euphytica* 131: 137-146.
- Miklas P.N., Kelly J.D., Steve E.B., Blair M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* 147: 105-131.
- Morales F.J. 1983. El mosaico común del frijol. Metodología de investigación y técnicas de control. CIAT, Cali, Colombia. 26 pp.

- Moreno C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M & T manuales y Tesis S.A. Vol. 1. Zaragoza, España. 82 pp.
- Mukeshimana G., Pañeda A., Rodríguez-Suárez C., Ferreira J.J., Giraldez R., Kelly J.D. 2005. Markers linked to the *bc-3* gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. *Euphytica* 144: 291-299.
- Nuez F. 2000. Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Eds: Nuez F. y Carrillo J.M. 153-293.
- Nodari R.O., Tsai S.M., Guzmán P., Gilbertson R.L., Gepts P. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134: 341-350.
- Pañeda A. 2005. Desarrollo de herramientas moleculares para la localización de genes de interés en la mejora genética de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 182 pp.
- Pañeda A., Rodríguez-Suárez C., Campa A., Ferreira J.J., Giraldez R. 2007. Molecular markers linked to the *fin* gene controlling determinate growth habit in common bean. *Euphytica*. En prensa.
- Pañeda A., Rodríguez-Suárez C., Ferreira J.J., Giraldez R. 2005. Molecular characterization and phylogeny of thirty common bean varieties *Annu Rep Bean Improv Coop* 48: 24-25.
- Papa R., Gepts P. 2003. Asymetry of gene flow and differential geographical structures of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from mesoamerica. *Theor Appl Genet* 106: 239-250.
- Paredes O.M., Gepts P. 1995. Extensive introgression of middle American germplasm into Chilean common bean cultivars. *Gen. Res. Crop Evol* 42: 29-41.
- Park S.O., Coyne D.P., Geunhwa J., Skroch P.W., Arnaud-Santana E., Steadman J.R., Ariyaratne H.M., Nienhuis J. 2000. Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean. *J Am Soc Hortic Sci* 125(4): 466-475.
- Parlevliet J.E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens: present situation. *Euphytica* 124: 147-156.

- Pastor-Corrales M.A. 1991. Estandarización de variedades diferenciales y designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology* 81: 694.
- Pastor-Corrales M.A., Tu J.C. 1994. Antracnosis. En: Problemas de producción del frijol en los trópicos. Eds: M.A. Pastor-Corrales y H.F. Schwartz. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 87-120.
- Pedrosa A., Vallejos C.E., Bachmair A., Schweizer D. 2003. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. *Theor Appl Genet* 106: 205-212.
- Pérez P., Esquivel G., Rosales R., Acosta-Gallegos J.A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52 (2): 172-180.
- Pérez-Vega E., Campa A., De la Rosa L., Giraldez R., Ferreira J.J. 2006a. Evaluation for resistance to anthracnose of a core collection established from the CRF-INIA common bean collection. *Annu Rep Bean Improv Coop* 49: 201-202.
- Pérez-Vega E., Fernández J., Campa A., De la Rosa L., Giraldez R., Ferreira J.J. 2006b. Validación de la colección nuclear de judías del CRF-INIA con la asistencia de caracteres morfológicos y proteínas de semilla. Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español. II Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas. 215-223.
- Prasad M., Varshney R.K., Roy J.K., Balyan H.S., Gupta P.K. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor Appl Genet* 100: 584-592.
- Puerta Romero J. 1961. Variedades de judía cultivadas en España. Monografía N° 11, Ministerio de Agricultura, Madrid. 798 pp.
- Reinoso B., Boto J.A., Morala M.G. 2007. Variedades locales de alubia o judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.) de la Provincia de León. Universidad de León, Secretariado de publicaciones. 150 pp.
- Rodiño A.P., Santalla M., De Ron A.M., Singh S.P. 2003. A core collection of common bean from the Iberian Peninsula. *Euphytica* 131: 165-175.
- Rodríguez-Suárez C. 2005. Identificación de genes de resistencia a antracnosis en judía (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 150 pp.

- Rodríguez-Suárez C., Ferreira J.J., Campa A., Pañeda A., Giraldez R. 2007a. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. *Theor Appl Genet*. En prensa.
- Rodríguez-Suárez C., Méndez-Vigo B., Pañeda A., Ferreira J.J., Giraldez R. 2007b. A genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. and localization of genes for specific resistance to six races of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Theor Appl Genet* 114: 713-722.
- Rohlf F.J. 1992. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York.
- Sánchez M. 2006. Incorporación de marcadores moleculares al mapa genético de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad de Oviedo. 31 pp.
- Santalla M., De Ron A., Voyset O. 2001. European bean market classes. In: Catalogue of bean genetic resources. Eds: Amurrio M., Santalla M., De Ron A. PHASELIEU FAIR PL 97-3463: 79-94.
- Santalla M., Rodino P., De Ron A. 2002. Allozyme evidences supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. *Theor Appl Genet* 104: 934-944.
- Sanz M.A., Atienza J. 1998 Análisis sensorial de la fabada. En: III Jornadas de análisis sensorial: sidra, carne, queso y faba de Asturias. Eds: CIATA. Principado de Asturias. 71-88.
- Schneider K.A., Grafton K.F., Kelly J.D. 2001. QTL analyses of resistance to Fusarium root en bean. *Crop Sci* 41: 535-542.
- Shii C.T., Mok M.C., Temple S.R., Mok D.W.S. 1980. Expression of developmental abnormalities in hybrids of *Phaseolus vulgaris* L. *J Hered* 71: 218-222.
- Singh S.P. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. 1982. *Annu Rep Bean Improv Coop* 25:92-94.
- Singh S.P., Gutiérrez A. 1984. Geographical distribution of the DL1 and DL2 genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L., their association with seed size, and their significance to breeding. *Euphytica* 33:337-345.

- Singh S.P., Gutiérrez A.J., Molina A., Urrea C., Gepts P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Sci* 31: 23-29.
- Singh S.P., Molina A. 1996. Inheritance of crippled trifoliolate leaves occurring in interracial crosses of common bean and its relationship with hybrid dwarfism. *J Hered* 87: 464-469.
- Tar'an B., Michaels T.E., Pauls K.P. 2002. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. *Crop Sci* 42: 544-556.
- Tar'an B., Michaels T.E., Pauls K.P. 2003. Marker-assisted selection for complex trait in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using QTL-based index. *Euphytica* 130: 423-432.
- Tohme J., Orlando-Gonzalez D., Beebe S., Duque M.C. 1996. AFLP análisis of gene pools bean core collection. *Crop Sci* 36: 1375-1384.
- Tsai S.M., Nodari R.O., Moon D.H., Camargo L.E.A., Vencovsky R., Gepts P. 1998. QTL mapping for nodule number and common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 204: 135-145.
- Tu, J.C. 1988. Control of bean anthracnose caused by the Delta and lambda race of *Colletotrichum lindemuthianum* in Canada. *Plant Dis* 72: 5-8.
- UPOV. 1994. French bean. Guidelines for the conduct of test for distinctness, uniformity and stability. [www.upov.int](http://www.upov.int).
- Vallejos C.E., Sakiyama N.S., Chase C.D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.
- van Hintum Th.J.L., Brown A.H.D., Spillane C., Hodgkin T. 2000. Core collections of plant genetic resources. IPGRI Technical Bulletin N° 3. IPGRI, Rome, Italy.
- van Ooijen J.W., Voorrips R.E. 2001. Join map © 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- van Schoohoven A., Pastor-Corrales M.A. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 53 pp.

- Voysest O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 195 pp.
- Wang S., Basten C.J., Zeng Z.B. 2006. Win QTL Cartographer ® 2.5. Software for maps quantitative trait loci. Statistical Genetics, North Carolina State University.
- Zizumbo-Villareal D., Colunga-García Marin P., Payró de la Cruz E., Delgado-Valerio P., Gepts P. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a mesoamerican region. *Crop Sci* 45: 1073-1083.