ACTAS AEL 7

VI Seminario de Judía

Seminario sobre la eficiencia del sistema simbiótico Phaseolus-Rhizobium y su incidencia en la genética y mejora (Proyecto CSIC i-COOP 2016SU0004)

La AEL y la reforma de la Política Agraria Común (PAC)

Actividades de la AEL en el Año Internacional de las Legumbres

ALFONSO CLEMENTE - ANTONIO M. DE RON (Coords.)





ACTAS AEL 7

VI Seminario de Judía

Seminario sobre la eficiencia del sistema simbiótico Phaseolus-Rhizobium y su incidencia en la genética y mejora (Proyecto CSIC i-COOP 2016SU0004)

La AEL y la reforma de la Política Agraria Común (PAC)

Actividades de la AEL en el Año Internacional de las Legumbres

ALFONSO CLEMENTE - ANTONIO M. DE RON (Coords.)

I.S.B.N.: 978-84-15275-61-9

Producción: Editorial Atrio S. L. C./ Dr. Martín Lagos, 2-1ºC 18005-Granada

Tlf./Fax: 958 26 42 54

e-mail: publicaciones@editorialatrio.es

www.editorialatrio.es

VI SEMINARIO DE JUDIA

SUMARIO

Presentación	5
Biodiversidad bacteriana. Conceptos y análisis	7
Diversidad del Germoplasma de judía en la Misión Biológica de Galicia-CSIC Antonio M. de Ron, A. Paula Rodiño, J. Dorinda Pose, Iria Portas	15
Recursos genéticos de Judía Común (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>) y sus rizobios asociados en suelos de su Centro de Origen Andino (proyecto CSIC i-COOP 2016SU0004)	27
Caracterización y estudio de introgresión en poblaciones de <i>Phaseolus vulgaris</i> del NOA (silvestres y primitivas)	35
Efecto del nitrato y el encharcamiento en la emisión del gas invernadero N ₂ O por la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli</i>	51
Colección de poblaciones de <i>Phaseolus vulgaris</i> del NOA (silvestres y primitivas)	63

Colección de rhizobia de la MBG-CSIC y estudio de su eficiencia simbiótica con judía	75
Aislamiento de endosimbiontes de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris (I.)</i> var. Huasca, procedentes de la Amazonia Peruana y evaluación de su efectividad simbiótica. Jean Francis SAAVEDRA-CÁRDENAS, Renzo ALFREDO VALDEZ-NUÑEZ, Jose Carlos ROJAS-GARCÍA, Winston Franz Ríos-Ruiz, Antonio Castellano-Hinojosa, Eulogio J. BEDMAR	93
ANEXO I. Posición de la Asociación Española de Leguminosas sobre la reforma de la PAC	105
ANEXO II. La Asociación Española de Leguminosas (AEL) en el Año Internacional de las Legumbres	115

Presentación

Este volumen, Actas AEL 7, contiene la contribución de los participantes en el VI Seminario de Judía y en el Seminario sobre la eficiencia del sistema simbiótico *Phaseolus-Rhizobium* (dentro del proyecto del CSIC i-COOP 2016SU0004) celebrado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) los días 25 y 26 de Octubre de 2016. A la celebración de estos Seminarios contribuyeron la Asociación Española de leguminosas (AEL), la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) y la Misión Biológica de Galicia (MBG), centros del CSIC en el Área de Ciencias Agrarias. Además, este volumen contiene la posición de la AEL sobre la reforma de la PAC y una descripción de las actividades realizadas por la AEL en relación a la celebración del Año Internacional de las Legumbres 2016.

ALFONSO CLEMENTE Presidente de la AEL ANTONIO M. DE RON Coordinador Científico

VI SEMINARIO DE JUDIA

Biodiversidad bacteriana. Conceptos y análisis

Eulogio J. Bedmar, Antonio Castellano-Hinojosa, David Correa-Galeote

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC). Granada, España.

Abstract

Bacteria are possibly the most abundant living beings in nature, but the study of their diversity is enormously complex. This is because, in contrast to eukaryotic species that can reproduce among them, there is no similar definition for a species in bacteria. These microorganisms reproduce by binary partition and, therefore, do not require sexual compatibility; in addition, they can transfer DNA between species that are not phylogenetically related. However, a number of techniques and methodologies have been developed that allow bacterial identification. This work describes the methods that have been developed over time for bacterial phylogenetic identification and classification.

Keywords

Biodiversity, culture methods, GeneBank, housekeeping genes, 16S rRNA gene.

Resumen

Las bacterias son, posiblemente, los seres vivos más abundantes en la naturaleza, y el estudio de su diversidad es de enorme complejidad. Ello se debe a que, en contraste con las especies eucariotas que pueden reproducirse entre ellas, no existe una definición de especie similar en las bacterias. Estos microorganismos se reproducen por partición binaria y, por tanto, no requieren compatibilidad sexual; además, pueden transferir ADN entre especies que no están filogenéticamente relacionadas. No obstante, se han desarrollado una serie de técnicas y metodologías que permiten la identificación bacteriana. En este trabajo se describen los métodos que se han desarrollado a lo largo del tiempo para la identificación y clasificación filogenética de bacterias.

Palabras clave

Bases de datos, biodiversidad, gen 16S rRNA, genes auxiliares, métodos de cultivo.

1. BIODIVERSIDAD BACTERIANA

El artículo 2º del Convenio sobre Diversidad Biológica (http://www.cbd. int/) define la biodiversidad como la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos los ecosistemas terrestres y marinos, otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte. Comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas. Este convenio se materializó durante la conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo que se celebró en Rio de Janeiro en 1992. España ratificó el convenio el 21 de diciembre de 1993.

El término biodiversidad se aplica a la diversidad o variedad biológica. Como la diversidad biológica actual es el resultado de un complejo e irrepetible proceso evolutivo, el concepto de biodiversidad va más allá del concepto de diversidad que se emplea clásicamente en Ecología, el cual hace referencia a que el reparto de los individuos entre las especies es consecuencia bien de las interacciones ecológicas entre ellos, bien de la relaciones entre estos y su

medio ambiente. En eucariotas, una especie contiene individuos que pueden reproducirse entre ellos para dar lugar a una descendencia fértil. En los dominios Bacteria y Archaea no existe una definición similar de especie similar ya que se reproducen por partición binaria que no requiere compatibilidad sexual. Además, Bacteria y Archaea pueden transferir ADN a otros microorganismos con los que no están filogenéticamente relacionados, por lo que no existe indicación de una clasificación ordenada. Debido a la gran dificultad para definir el propio concepto de especie bacteriana se ha acuñado el término Unidad Taxonómica Operativa (Operational Taxonomic Unit, OTU) para definir el nivel taxonómico que el usuario confiere a una muestra en estudio, tal como individuo, población, especie, género, cepa, etc. A esta distinción se llega mediante análisis de genes marcadores, habitualmente el 16S rARN, y un porcentaje umbral de semejanza que permite clasificarlos en el mismo o diferente OTU.

2. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA

Se estima que 1 g de suelo contiene más de 10⁸ bacterias, lo que indica una enorme diversidad biológica, posiblemente mayor que la de cualquier otro grupo de seres vivos en la Naturaleza. ¿Cómo analizar esa biodiversidad?

2.1. Métodos dependientes del cultivo celular

El análisis de la diversidad bacteriana basado en métodos dependientes de cultivo es el método tradicional para su estudio. Para ello, se emplean diversos medios de laboratorio que permiten el cultivo de las bacterias. Se ha formulado una amplia variedad de medios de cultivo de manera que se pueda obtener el mayor número posible de diferentes unidades formadoras de colonias. Una vez aisladas las bacterias en medios de cultivo, su identificación y clasificación taxonómica se realiza empleando diversas técnicas, tanto fenotípicas como genotípicas y, finalmente, se procede a su almacenamiento y conservación.

Los métodos fenotípicos para identificación de bacterias se basan en el estudio de:

1. Las características morfológicas y fisiológicas, entre ellas: a) la morfología de las colonias; b) la utilización de fuentes de carbono y/o de nitrógeno, etc.

- 2. Métodos químicos, entre los que destacan: a) la composición de la pared celular; b) la composición y estructura de los polisacáridos celulares y del peptidoglicano; c) composición en ácidos teicoicos, etc.
- 3. Productos metabólicos, entre ellos, los ácidos grasos (FAME), etc.
- 4. La célula completa, para su estudio mediante: a) pirólisis; b) el empleo de bacteriófagos; c) la producción de bacteriocinas, etc.
- 5. Producción de proteínas, de las que se puede analizar: a) su perfil electroforético; b) la composición en citocromos; c) el perfil de isoenzimas (multi locus enzyme profile, MLEE); d) su serología (ELISA).

No obstante, las características fenotípicas no aseguran su reproducibilidad biológica y, en la mayoría de los casos, no reflejan la relación genética entre las bacterias. Además, se ha estimado que el número de bacterias que pueden aislarse de muestras medioambientales no supera el 10% de las que, en realidad, pueden ocurrir en ese ecosistema. Esas limitaciones se han asociado a la dificultad de reproducir, en condiciones de laboratorio, los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas que ocurren en condiciones naturales. La posible toxicidad del medio, la auxotrofia producida por pérdida de nutrientes, supresión de las bacterias de lento crecimiento por aquellas de crecimiento más rápido, dificultad de reproducción en condiciones de laboratorio por la ausencia de interacciones inter- e intra-específicas que ocurren en la naturaleza, entre otras, también se han considerado como factores que limitan el cultivo bacteriano en medios de laboratorio. En condiciones medioambientales, las comunidades bacterianas han evolucionado a lo largo de millones de años de selección natural y han establecido, a través de múltiples interacciones, diversos consorcios microbianos difíciles de simular de manera artificial. En definitiva, si una bacteria no se puede cultivar en el laboratorio no es accesible para su posterior análisis.

Para resolver estos problemas nacieron los métodos independientes del cultivo bacteriano, por lo que el desarrollo de los métodos genotípicos (moleculares) de identificación de biodiversidad representa un avance complementario y necesario para el estudio de la diversidad microbiana.

A pesar de sus limitaciones, el empleo de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias es una herramienta útil y complementaria de los métodos independientes de cultivo para estudios de fisiología, bioquímica y genética mi-

crobiana. Estos métodos sirven también para confirmar los datos derivados de la observación de procesos ecológicos y para valuar hipótesis originadas a partir de estudios de genómica y metagenómica.

2.2. Métodos independientes del cultivo celular

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es una técnica de Biología Molecular desarrollada por K. B. Mullis entre 1983 y 1986 por la que se puede obtener un gran número de copias de un fragmento determinado de ADN partiendo, en teoría, de una única copia de ese ADN (Mullis 1990). Por su interés en Medicina, Biología, Biotecnología, Ciencias Forenses, etc., Mullis recibió el premio Nobel de Química en 1993. Entre sus múltiples aplicaciones destacan la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas usadas en técnicas forenses, pruebas de paternidad, detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas, etc. Los grandes avances científicos, no obstante, ocurren, en la mayoría de las ocasiones, gracias al desarrollo de la tecnología que las hace posibles. Este es el caso del termociclador, indispensable para que pueda llevarse a cabo la PCR. El empleo de polimerasas resistentes a elevadas temperaturas, de la electroforesis en geles de agarosa, de los secuenciadores de ADN y de programas informáticos que permiten la lectura y manejo de los datos que proporciona la secuenciación, son fundamentales para el intenso empleo que se hace actualmente de la PCR. De enorme importancia en esta técnica es el uso de cebadores (primers), que son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región complementaria al ADN molde que se desea amplificar e inician la reacción de extensión del ADN por la ADN polimerasa.

2.3. Marcador filogenético universal: El gen 16S rARN

La subunidad pequeña que constituye los ribosomas está codificada por el gen *rrn16S* (16S rARN), su tamaño molecular, aunque variable, oscila alrededor de las 1.500 pares de bases, y posee una serie de características que lo hacen ideal para su empleo en identificación y filogenia bacteriana; entre ellas: a) está

conservado en todas las bacterias, y tiene la misma función en cada una de ellas; b) diferentes regiones de la molécula de ADN presentan distinto grado de variabilidad en su secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferentes niveles de resolución; c) el gen se transfiere de manera vertical; y d) la longitud de su secuencia permite su fácil manejo "in silico". El depósito de millones de secuencias de ADN de los genes 16S rARN en las Bases de Datos permite el análisis comparativo de este tipo de secuencias. Weisburg et al. (1991) fueron pioneros en diseñar un par de cebadores capaces de amplificar la secuencia casi completa del gen 16S rARN de un amplio número de bacterias filogenéticamente separadas. Actualmente, hay una amplia colección de cebadores que permiten la amplificación de distintos fragmentos del ADN del gen 16S rARN.

2.4. Bases de datos

El National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi. nlm.nih.gov) es parte de la National Library of Medicine de los Estados Unidos, una rama de los National Institutes of Health (NIH). Está localizado en Bethesda (Maryland) y se fundó en 1988 con la misión de ser fuente de información de Biología Molecular. GenBank es la base de datos de secuencias génicas del NIH, una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN. Todas las bases de datos del NCBI están disponibles en Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/). GenBank es parte del International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que está integrado por la base de datos de ADN de Japón (DNA DataBank of Japan, DDBJ, http://www.ddbj.nig.ac.jp/), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory, EMBL, http://www.embl.de/) y el GenBank del European Bioinformatics Institute (EBI, http://www.ebi.ac.uk), un instituto de investigación académica ubicado en el Wellcome Trust Genome Campus, en Hinxton, cerca de Cambridge (UK), que es parte del EMBL.

3. OTROS GENES MARCADORES (GENES HOUSEKEEPING)

Las secuencias del gen 16S rARN de especies bacterianas abundantes están muy conservadas, por lo que no se puede utilizar para su identificación. Es necesario, por tanto, el empleo de otros genes para establecer las relaciones

filogenéticas entre ellas. En todos los casos debe tratarse de genes esenciales, esto es, que sean necesarios para el funcionamiento normal de la bacteria, que no estén sujetos a transferencia horizontal y, a ser posible, de los que sólo exista una copia.

Además del gen rrn16S, el operón rrn está constituido por otros dos genes, rrn235 y rrn55 que codifican las subunidades 235 y 55 de los ribosomas, respectivamente. De forma similar al gen rrn16S, el rrn23S posee regiones conservadas que pueden utilizarse para la identificación de procariotas. El análisis del ADN entre los genes rrn16S y rrn23S (Internal Transcribed Spacer, ITS) se utiliza ampliamente en taxonomía y filogenia molecular debido a su elevado grado de variación incluso entre especies relacionadas, quizás debido a la escasa presión evolutiva que se ha ejercido sobre sus secuencias no funcionales. Puesto que los ITS presentan una elevada heterogeneidad en tamaño y en secuencia, su análisis constituye una técnica de alta resolución que permite asignar filogenéticamente a los miembros de una comunidad o población bacteriana a nivel de subespecie. Otros genes que pueden utilizarse de manera alternativa a los que componen el operón rrn son: a) atpD, cuyo producto está implicado en la síntesis de ATP; b) qlnII, responsable de la producción de la enzima glutamina sintetasa, que interviene en la asimilación del amonio; c) rpoA/B, que codifican la subunidad α y β de la ARN polimerasa, respectivamente d) dnaE, que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa; e) fusA, que da lugar a la producción del factor de elongación de las cadenas de ADN; f) pheS, codifica la subunidad α de la fenilalanil tARN sintasa; g) recA y radA, cuyos productos permiten la reparación y mantenimiento del ADN; h) qyrA/B, que codifican las subunidades α y β de la ADN girasa; y i) hsp70, que da lugar a la formación de una chaperona que se requiere para el plegamiento de proteínas.

Puesto que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de diferentes ecosistemas terrestres, acuáticos, marinos y atmosféricos, existe la necesidad de entender la estructura y funciones de las comunidades microbianas, así como las variaciones que puedan ocurrir en las mismas en respuesta a los factores ambientales que puedan modificarla. Para responder a estas cuestiones se hizo necesario el desarrollo de técnicas que permitieran la secuenciación económica y el análisis rápido y reproducible de múltiples secuencias de ADN procedentes de muestras de tales ecosistemas. Se

dio así lugar al desarrollo de la metagenómica y de los nuevos sistemas de secuenciación (Next Generation Sequencing, NGS). Estas tecnologías evitan la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que componen la comunidad y permiten la amplificación y secuenciación de miles de millones de secuencias del gen 16S rARN a partir de ADN extraído de muestras medioambientales. En este artículo no se trata de estas nuevas tecnologías que, se espera, puedan presentarse más adelante en otra Acta AEL.

BIBLIOGRAFÍA

MULLIS KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Amer. 262: 56-65.

WEISBURG WG, BARNS SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.

VI SEMINARIO DE JUDIA

Diversidad del Germoplasma de judía en la Misión Biológica de Galicia-CSIC

Antonio M. DE RON, A. Paula RODIÑO, J. Dorinda POSE, Iria PORTAS

Biología de Agrosistemas, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC). Pontevedra, España

Abstract

In the Iberian Peninsula there is still a considerable amount of genetic diversity in many cultivated plants. Over the years adapted populations of legume crops such as beans (Phaseolus spp.) were grown by farmers but currently new improved varieties have displaced the traditional ones in the areas of production of Spain. Additionally, in recent years the cultivation of beans has been abandoned, probably because of their low profitability, and consumer demand is met by imports. For these reasons, the MBG-CSIC, together with other institutions, has participated in collection missions and is carrying out a programme for maintaining and regenerating beans germplasm. The current beans collection at the MBG-CSIC includes several *Phaseolus* species that are being used for genetic and evolutionary studies as well as for breeding purposes.

Keywords

Biodiversity, breeding, landraces, *Phaseolus*, plant genetic resources.

Resumen

En la Península Ibérica todavía existe una considerable diversidad genética en las especies vegetales cultivadas. Durante años los agricultores cultivaron variedades adaptadas de diversas especies, como las judías (Phaseolus spp.) pero las nuevas variedades mejoradas han desplazado a las tradicionales en muchas áreas de producción. Además, en los últimos años el cultivo de judías se ha ido abandonando, probablemente por su escasa rentabilidad, y la demanda de los consumidores se satisface con importaciones. Por estas razones, la MBG-CSIC, junto con otras instituciones ha participado en expediciones de recolección de germoplasma de judías así como en su mantenimiento y regeneración. La colección actual de germoplasma de judías de la MBG-CSIC incluye varias especies de *Phaseolus*, que están siendo utilizadas en estudios genéticos y evolutivos, así como para mejora genética.

Palabras clave

Biodiversidad, mejora genética, *Phaseolus*, recursos fitogenéticos, variedades locales.

INTRODUCCIÓN

Freytag y Debouck (2002) describieron más de 400 especies del género *Phaseolus*, de las cuales únicamente cinco han sido domesticadas y se cultivan actualmente: *P. vulgaris* L. (judía común), *P. lunatus* L. (judía de Lima), *P. coccineus* L. (judía escarlata), *P. polyanthus* Greenman, que guarda gran semejanza con la anterior, y por último *P. acutifolius* A. Gray (judía tépari). Dentro del género *Phaseolus* existen diferentes grupos naturales o acervos genéticos, que en el caso de la judía común se muestran en la tabla 1 (Gepts y Debouck 1991).

Tabla 1.
Acervos genéticos de *P. vulgaris*.

Acervo	Especies
Primario	P. vulgaris: poblaciones silvestres y variedades cultivadas
Secundario	P. coccineus, P. polyanthus, P. costaricensis
Terciario	P. acutifolius, P. parvifolius
Cuaternario	P. lunatus

La judía común es actualmente el cultivo proteico de mayor presencia en la dieta humana. El grano de la judía, además de ser una importante fuente de proteínas, contiene vitaminas, minerales y fibra. Estudios recientes indican que el contenido en polifenoles puede tener un efecto protector frente al riesgo de enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer, por su efecto antioxidante (Xu y Chang 2007).

En España existen numerosas variedades tradicionales de judía común en diferentes zonas que reciben nombres locales como alubia, caparrón, faba, fréjol, feixón, garbanzo, haba, habichuela, judía, mongeta, pocha, etc. Estas variedades han tenido gran importancia en la producción agraria y en la alimentación; sin embargo en los últimos años el cultivo de judía se ha ido abandonando, probablemente por su escasa rentabilidad, y en la demanda actual el mercado se satisface con importaciones, generalmente de baja calidad de grano. Los agricultores tradicionalmente han seleccionado y conservado multitud de variedades locales de judía, manteniendo su propia semilla año tras año, por lo que estas variedades constituyen un recurso genético imprescindible para los mejoradores, debido a su amplia variación genética y su adaptación a las condiciones ambientales después de muchos años de cultivo. Por estas razones, la MBG-CSIC, junto con otras instituciones, ha participado en expediciones de recolección de germoplasma de variedades tradicionales (y silvestres) de judías, así como en el mantenimiento y estudio de su diversidad genética, y su regeneración.

En el mercado nacional e internacional, la competitividad de las judías españolas, tiene que suponer la mejora de la calidad comercial de las mismas, buscando un valor añadido del producto final, en comparación con la calidad de las

judías importadas. Actualmente los consumidores demandan una mayor calidad y una mejor información sobre la naturaleza, los métodos de producción y las características específicas de los productos agrícolas. Debido a ello, actualmente existen Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) y Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) en diversas zonas de producción de España, lo cual supone un importante apoyo a la producción y el consumo de variedades locales autóctonas de judía (De Ron et al. 2016).



Figura 1. Expedición al NO de Argentina en 1996.

Tabla 2. Colección de germoplasma de *Phaseolus* de la MBG-CSIC.

Especie	Colección	Referencias
P. vulgaris	2014 entradas (44 poblaciones silvestres) >500 líneas de mejora y líneas consanguíneas recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs) >2000 líneas mutantes colección nuclear: 52 entradas	De Ron et al. 1997 Menéndez- Sevillano 2002 Rodiño et al. 2003
P. coccineus	49 entradas	Santalla et al. 2004

Especie	Colección	Referencias
P. augusti	5 entradas silvestres	
P. acutifolius	3 entradas	
P. parvofolius	1 entrada silvestre	

COLECCIÓN DE JUDÍA DE LA MBG-CSIC

La MBG-CSIC tiene en marcha desde 1987 un programa de recolección, conservación y evaluación de germoplasma de judías (De Ron et al. 1991). Este material genético se ha estudiado desde el punto de vista fenotípico (morfoagronomía, calidad, tolerancia a estreses bióticos y abióticos), genético, evolutivo y molecular, para su uso en mejora vegetal. Parte de la colección ha sido colectada por su propio personal en expediciones de colección en España, Portugal y Argentina (Menéndez-Sevillano et al. 1997) (figura 1) y otra parte procede del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF-INIA, Alcalá de Henares, España) y otras instituciones.

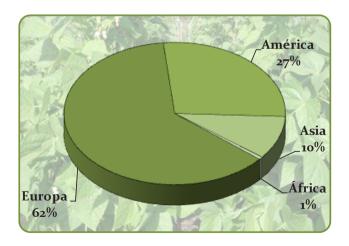


Figura 2. Distribución por continentes de las entradas de *P. vulgaris* L. de la colección de germoplasma de la MBG-CSIC (De Ron et al. 2011).

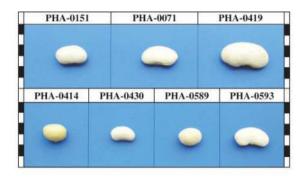
El material genético se conserva en cámaras a 5° C de temperatura y humedad relativa del 40%, condiciones adecuadas para una conservación a medio plazo. Las variedades se regeneran periódicamente en el campo, invernadero o casa de malla y se envían duplicados al CRF-INIA, cuando procede (tabla 2).



Figura 3. Flor de P. coccineus, PHC-0036, variedad de la MBG-CSIC.

DIVERSIDAD DE LA COLECCIÓN DE JUDÍA COMÚN

Según Ortwin-Sauer (1966) las primeras variedades de judía común llegaron a la Península Ibérica desde Centroamérica hacia 1506, mientras que las de origen sudamericano habrían llegado a la Península posteriormente, por medio de mercaderes que probablemente trajeron las semillas como una curiosidad, por sus variadas formas y colores (Brücher y Brücher 1976). Este germoplasma se adaptó a nuevos ambientes, en cuanto a condiciones ambientales y sistemas de cultivo, especialmente en el N y NO de la Península Ibérica, que es el área en la que se ha encontrado una mayor variabilidad genética de judía (Santalla et al. 2002).



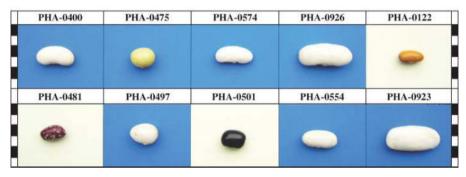


Figura 4. Variedades locales de los acervos Mesoamericano y Andino típicas (MT, AT), extremas (ME, AE), y recombinantes (MR, AR). PHA-0151 (MT), PHA-0071 (ME), PHA-0419 (ME), PHA-0414 (MR), PHA-0430 (MR), PHA-0589 (MR), PHA-0593 (MR), PHA-0400 (AT), PHA-0475 (AE), PHA-0574 (AE), PHA-0926 (AE), PHA-0122 (AR), PHA-0481 (AR), PHA-0497 (AR), PHA-0501 (AR), PHA-0554 (AR), PHA-0923 (AR) (Rodiño et al. 2006).

Después de la introducción de la judía en la Península, las variedades de los acervos genéticos Mesoamericano y Andino se cultivaron en proximidad, lo que favorecería el flujo de genes entre ambos, lo que no había sucedido de manera generalizada en América, por su aislamiento geográfico, y probablemente genético. Esto dio lugar a eventos de recombinación entre ambos acervos genéticos, lo que llevó a que surgiesen variedades genéticamente intermedias, con fenotipos tanto Mesoamericanos como Andinos que no se corresponden exactamente con la descripción de las razas de judía de Singh et al. (1991). Este proceso ha motivado que se considere a la Península Ibérica un centro secundario de diversificación de la judía común (Santalla et al. 2002, Rodiño et al. 2006) (figura 4).

Las variedades Andinas y Mesoamericanas de judía, a pesar de su histórico parcial aislamiento reproductivo, pueden hibridarse entre ellas, con pocas excepciones, con descendencia fértil y viable. Por esta razón es posible transferir algunos caracteres entre ambos acervos genéticos, lo cual tiene importancia en mejora genética ya que las variedades Mesoamericanas, por ejemplo, tienen mayor frecuencia de genes de resistencia a enfermedades, mientras que las Andinas presentan un grano de mayor tamaño y calidad, demandado en España. Sin embargo, hay caracteres de difícil transferencia entre acervos, por lo que el hecho de disponer, en su centro de diversificación secundario, de variedades recombinantes entre ambos acervos es una oportunidad interesante para la mejora genética ya que facilita el intercambio de genes entre estas variedades, tanto con las del acervo Andino como las del Mesoamericano (Rodiño et al. 2006).

La diversidad de la judía tiene una clara incidencia en el mercado y en el consumo. Habitualmente la judía grano se consume cocida, tras un remojo de varias horas, y acompañada de carnes o de alimentos de origen vegetal como cereales (especialmente arroz), patata y otros tubérculos y hortalizas.



Figura 5. Nuñas: crudas (izda.) y tostadas (dcha.).

En algunos lugares también se consumen los granos tiernos o inmaduros, siendo ejemplos las "pochas" en España y el tipo "borlotto", muy popular en Italia. También la variedad "verdina" o "flageolet", con gran tradición en el Norte de España y en Francia, se cosecha en estado inmaduro y se deja secar en oscuridad, manteniendo su grano un color verde claro y un tegumento brillante, muy apreciado en restauración. En Galicia (región del NO de España) este tipo varietal se denomina "Faba do marisco" por su adecuación para elaborarse con productos del mar, como mariscos, pescados, incluso algas. Otro caso diferente son las "nuñas", variedades ancestrales de los Andes, en las que al calentar su grano seco durante 2-3 minutos, éste se tuesta, aumenta de tamaño y adquiere una textura comestible, por lo que puede consumirse como fruto seco, teniendo múltiples posibilidades de procesado, con diferentes aromas y condimentos, con sal, confitadas, en ensaladas, postres, etc. (figura 5)

La variabilidad de la colección de judías de la MBG-CSIC, especialmente en las variedades locales de judía común, puede proporcionar, por selección, un material genético superior, tanto en lo que se refiere a resistencia a enfermedades como en caracteres agronómicos y de calidad (Casañas 1999). Los progresos recientes en el conocimiento del genoma de la judía común (Schmutz et al. 2014, De Ron et al. 2015, Vlasova et al. 2016) ya están aportando nuevas posibilidades en la mejora genética de la judía, en rendimiento, calidad, tolerancia a estreses bióticos y abióticos, y asimismo en la eficiencia del sistema simbiótico con rizobios, de gran importancia ambiental.

Finalmente, debe concluirse que el conocimiento del origen de la judía común, su diversidad y su evolución (Bellucci et al. 2014), es una información de gran importancia para un manejo más adecuado y eficiente de los recursos genéticos en los programas de conservación de la agro-biodiversidad y de la mejora genética de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, proyecto i-COOP 2016SU0004), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, proyectos RFP2013-00001

y RFP2015-00008-C04-03), de la Xunta de Galicia (Contrato-Programa CSIC OTR00114) y de la Diputación de Pontevedra (cesión de infraestructuras).

BIBLIOGRAFÍA

- Bellucci E, Bitocchi E, Rau D, Rodríguez M, Biagetti E, Giardini A, Attene G, Nanni L, Papa R. 2014. Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*. En: Tuberosa R, Graner EA, Frison E (eds.), Genomics of plant genetic resources: 483-507. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- BRÜCHER B, BRÜCHER H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Econ. Bot. 30: 257-272.
- CASAÑAS F. 1999. Characteristics of a common bean landrace (*Phaseolous vulgaris* L.) of great culinary value and selection of a commercial inbred. J. Sci. Food Agric. 79: 693-698.
- DE RON AM, LINDNER R, MALVAR RA, ORDÁS A, BALADRÓN JJ, GIL J. 1991. Germplasm collecting and characterization in the north of the Iberian Peninsula. Plant Genet. Resour. Newsl. 87: 17-19.
- DE RON AM, SANTALLA M, BARCALA N, RODIÑO AP, CASQUERO PA, MENÉNDEZ MC. 1997. Beans (*Phaseolus* spp.) collection at the MBG-CSIC in Spain. Plant Genet. Resour. Newsl. 112: 100.
- DE RON AM (coord.), GONZÁLEZ AM, DE LA FUENTE M, RODIÑO AP, MANSILLA JP, SABURIDO MS, SANTALLA M. 2011. Catálogo de germoplasma de *Phaseolus* de la Misión Biológica de Galicia CSIC. MBG-CSIC/INIA/AEL. Pontevedra, España.
- DE RON AM, PAPA R, BITOCCHI E, GONZÁLEZ AM, DEBOUCK DG, BRICK MA, FOURIE D, MARSOLAIS F, BEAVER J, GEFFROY V, MCCLEAN P, SANTALLA M, LOZANO R, YUSTE-LISBONA FJ, CASQUERO PA. 2015. Common bean. En: AM De Ron (ed.), Grain Legumes, Series: Handbook of Plant Breeding: 1-36. Springer Science+Business Media, New York.
- DE RON AM, RUBIALES D, GONZÁLEZ BERNAL MJ, SUSO MJ, GIL J, RUBIO J, CÓRDOBA EM, NADAL A, PÉREZ DE LA VEGA M, ALONSO PONGA J, DE MIGUEL E. 2016. Las legumbres en España. En: Clemente A, De Ron AM (Coords.), Las Legumbres: 35-78. CSIC-Editorial Catarata. Madrid. España.

- FREYTAG GF, DEBOUCK DG. 2002. Taxonomy, distibution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae-Papilionoideae*) in North America, Mexico and Central America. SIDA Bot. Misc. 23: 1-300.
- GEPTS P, DEBOUCK D. 1991. Origin, domestication, and evolution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). <u>En</u>: A van Schoonhoven and O Voyest (eds.) Common beans: research for crop improvement: 7-53. C.A.B. Intl., Wallingford and CIAT, Cali.
- MENÉNDEZ-SEVILLANO MC, DE RON AM, NEUMANN R. 1997. Recolección de germoplasma de *Phaseolus* en el Noroeste Argentino. Actas de Horticultura 17: 282-287.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC. 2002. Estudio y conservación del germoplasma silvestre y primitivo de *Phaseolus vulgaris* L. en el Noroeste de Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- SAUER CO. 1966. The early Spanish men. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, USA.
- RODIÑO AP, SANTALLA M, DE RON AM, SINGH SP. 2003. A core collection of common bean from the Iberian Peninsula. Euphytica 131: 165-175.
- RODIÑO AP, GONZÁLEZ AM, SANTALLA M, DE RON AM, SINGH SP. 2006. Novel genetic variation in common bean from the Iberian Peninsula. Crop Sci. 46: 2540-2546.
- SANTALLA M, RODIÑO AP, DE RON AM. 2002. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for common bean. Theor. Appl. Genet. 104: 934-944.
- SANTALLA M, MONTEAGUDO AM, GONZÁLEZ AM, DE RON AM. 2004. Agronomical and quality traits of runner bean germplasm and implications for breeding. Euphytica 135: 205-215.
- SINGH SP, GEPTS P, DEBOUCK DG. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris Fabaceae*). Econ. Bot. 45: 379-396.
- SCHMUTZ J, MCCLEAN PE, MAMIDI S, WU GA, CANNON SB, GRIMWOOD J, JENKINS J, SHU S, SONG Q, CHAVARRO C, TORRES-TORRES M, GEFFROY V, MOGHADDAM SM, GAO D, ABERNATHY B, BARRY K, BLAIR M, BRICK MA, CHOVATIA M, GEPTS P, GOODSTEIN DM, GONZALES M, HELLSTEN U, HYTEN DL, JIA G, KELLY JD, KUDRNA D, LEE R, RICHARD MM, MIKLAS PN, OSORNO JM, RODRIGUES J, THAREAU V, URREA CA, WANG M, YU Y, ZHANG M, WING RA, CREGAN PB, ROKHSAR DS, JACK-

- SON SA. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. Nature Genet. 46: 707-713.
- VLASOVA A, CAPELLA-GUTIÉRREZ S, RENDÓN-ANAYA M, HERNÁNDEZ-OÑATE M, MINOCHE AE, ERB I, CÂMARA F, PRIETO-BARJA P, CORVELO A, SANSEVERINO W, WESTERGAARD G, DOHM JC, PAPPAS JR GJ, SABURIDO-ALVAREZ S, KEDRA D, GONZALEZ I, COZZUTO L, GÓMEZ-GARRIDO J, AGUILAR-MORÓN MA, ANDREU N, AGUILAR OM, GARCIA-MAS J, ZEHNSDORF M, VÁZQUEZ MP, DELGADO-SALINAS A, DELAYE L, LOWY E, MENTABERRY A, VIANELLO-BRONDANI RP, GARCÍA JL, ALIOTO T, SÁNCHEZ F, HIMMELBAUER H, SANTALLA M, NOTREDAME C, GABALDÓN T, HERRERA-ESTRELLA A, GUIGÓ R. 2016. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. Genome Biol. 17: 32.
- XU B, CHANG S. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. J. Food Sci. 72: S159-S166.

VI SEMINARIO DE JUDIA

Recursos genéticos de Judía Común (*Phaseolus vulgaris L.*) y sus rizobios asociados en suelos de su Centro de Origen Andino (proyecto CSIC i-COOP 2016SU0004)

Antonio M. De Ron¹, A. Paula Rodiño¹, M. Carmen Menéndez Sevillano², Mariana J. Ferreyra², Luis IBARRa², Gustavo González Anta³, Eulogio J. Bedmar⁴

1 Biología de Agrosistemas, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC). Pontevedra, España

2 Estación Experimental Agropecuaria Salta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Salta, Argentina

3 Rizobacter. Palermo, Argentina

4 Departamento de Microbiología del suelo y Sistemas simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC). Granada, España

Abstract

The project covers two topics: (i) legumes, common bean: its genetic diversity and its cultivation; and (ii) soils: their diversity and the associated microbiota (rhizobia). The objectives of the project are to complete the collection of wild and primitive common bean germplasm of the Argentinean Northwest gene bank (BANOA) of the Agricultural Experiment Station (EEA) - National Institute of Agricultural Technology (INTA) of Argentina. Also, to contribute to the knowledge of the biodiversity of the wild and primitive populations of common bean from the northwest of Argentina (NOA) of the Andean center of domestication of the species and to determine the degree of introgression of the wild populations. Likewise, it is proposed to analyze the diversity and physicochemical properties of the soils of bean cultivation, the isolation and taxonomic identification of

the rhizobia strains of the nodules and the analysis of the most efficient rhizobia-bean symbiotic interactions to achieve higher bean yield.

Keywords

Biodiversity, biological fixation of nitrogen, domestication, introgression, symbiosis.

Resumen

El proyecto abarca dos temas: i) las leguminosas, la judía o poroto común: su diversidad genética y su cultivo y ii) los suelos: su diversidad y la microbiota (rizobios) asociada. Los objetivos del proyecto se orientan a completar la colección de germoplasma silvestre y primitivo de judía/poroto del Banco de germoplasma del Noroeste Argentino (BANOA) de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA)-Salta del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina; contribuir al conocimiento de la biodiversidad de las poblaciones silvestres y primitivas de judía común/poroto del noroeste de Argentina (NOA) del centro de domesticación andino y determinar el grado de introgresión en las poblaciones silvestres. Asimismo se plantea analizar la diversidad y propiedades físicoquímicas de los suelos de cultivo de judía/poroto y aislamiento e identificación taxonómica de las cepas de rizobios de los nódulos; y análisis de las interacciones simbióticas rizobios-judía más eficientes para conseguir mayor rendimiento de la judía/poroto.

Palabras clave

Biodiversidad, domesticación, fijación biológica de nitrógeno, introgresión, simbiosis.

INTRODUCCIÓN

La judía o poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa autógama de porte herbáceo y origen americano que se difundió al resto del mundo a partir del siglo XVI. Esta especie es la principal leguminosa para consumo

humano directo y es un constituyente fundamental de la dieta en varios países latinoamericanos, africanos y asiáticos, debido a su alto contenido en proteínas y a que se complementa con alimentos ricos en glúcidos, como el arroz, maíz y otros cereales. Diversos estudios indican que la judía presenta dos centros de domesticación, uno al sur de los Andes, que se extiende desde el sur de Perú hasta el noroeste de Argentina (NOA) y otro en Mesoamérica (en el centro-oeste de México). El presunto centro de domesticación en Mesoamérica está situado en una región del estado de Jalisco (México), mientras que el sitio de domesticación para el pool génico andino aún no se ha establecido con claridad. Las leguminosas tienen la capacidad de formar simbiosis mutualistas fijadoras de N₂ atmosférico con bacterias diazotrofas.

El conocimiento de la existencia de estas bacterias data de finales del siglo XIX cuando, por primera vez Frank, en 1889, denominó Rhizobium leguminosarum a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas, y fue este nombre el que dio origen al genérico de rizobios para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. Consecuencia directa de la capacidad de fijar N₂ es que las leguminosas crecen en suelos pobres, áridos, de bajo contenido en N y escasa fertilidad, por lo que se utilizan como plantas pioneras en la recuperación de suelos deteriorados, así como en procesos de revegetación y fitorrecuperación. De manera tradicional también se emplean en rotación de cultivos, sobre todo con cereales, para mantener la fertilidad del suelo. Actualmente se sabe que la judía puede establecer simbiosis con, al menos, 5 especies del género Rhizobium. No obstante, a pesar de su capacidad para formar nódulos con distintas especies de rizobios, se considera que la judía es de escasa capacidad fijadora de N₃ cuando se compara con otras leguminosas, lo que se ha atribuido tanto a la ineficiencia de los rizobios nativos de un determinado suelo como al efecto negativo que distintos factores ambientales ejercen sobre la simbiosis.

Las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca, en el noroeste argentino, constituyen el límite sur del centro andino de domesticación de la judía y albergan un gran número de poblaciones primitivas y silvestres, que representan una proporción importante de la variabilidad genética de la especie. El BANOA mantiene una importante colección de poblaciones de judía o poroto, que incluye formas silvestres y primitivas colectadas en el NOA. El empleo de métodos

morfológicos y agronómicos ha demostrado la existencia de una gran variabilidad, tanto intra- como inter-poblacional entre estas formas de judía. Aunque solo un 25% de las entradas del BANOA se ha caracterizado a nivel molecular, se ha observado un importante grado de introgresión en las poblaciones silvestres a partir del material cultivado, lo que ha producido cambios en las frecuencias alélicas del acervo génico silvestre. Actualmente gran cantidad de ambientes naturales están retrocediendo o desapareciendo, o están siendo afectados por el continuo crecimiento de la población mundial, afectando a la biodiversidad tanto de las leguminosas como de las especies bacterianas asociadas, a veces incluso antes de que se descubran. El conocimiento actual sobre las interacciones suelo-leguminosa-bacteria en áreas del NOA donde se cultivan las variedades comerciales de judía/poroto y también donde crecen las poblaciones silvestres y primitivas es escaso y, particularmente, el papel de los rizobios en vastas áreas de cultivo de judía en el NOA no se ha explorado aún.

EQUIPOS PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

Banco activo de germoplasma de la EEA Salta del INTA (INTA-SALTA)

El grupo trabaja hace más de 40 años en la colección, conservación y caracterización de germoplasma de poroto del NOA a fin de poner el germoplasma conservado en condiciones de uso para mejora genética, reinserción de germoplasma en los campos de aquellos productores que hubieran perdido algunos tipos y para otros estudios científicos. El banco posee una colección de 700 poblaciones primitivas y silvestres de poroto obtenidas de las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca.

Rizobacter

La empresa Rizobacter está orientada al tratamiento de semillas, mediante diversas tecnologías. La cartera de productos en Argentina incluye inoculantes, terápicos para semillas, fertilizantes biológicos, coadyuvantes y fertilizantes de uso agrícola, micronutrientes, pildorado de semilla, cebos para el control de plagas e insecticidas para el control en granos almacenados.

Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC)

Participa el Grupo de Investigación de Biología de Agrosistemas (BAS) de la Misión Biológica de Galicia. Sus líneas de investigación, desde 1987, se orientan a los recursos genéticos (colección de más de 2500 entradas) y la mejora de leguminosas, especialmente judía/poroto, y al estudio del sistema simbiótico con rizobios.

Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC)

Participan los miembros del Grupo de Investigación Metabolismo del Nitrógeno del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín. El Grupo acredita más de 30 años de experiencia en la interacción suelo-planta-bacteria-medio ambiente, particularmente en el ciclo del N.

OBJETIVOS

Los objetivos de este proyecto son los siguientes:

- Completar la colección de germoplasma silvestre y primitivo de judía/ poroto del BANOA, mediante colectas en diferentes lugares del centro de domesticación andino.
- Estudio fenotípico y genotípico de poblaciones de poroto/judía del BA-NOA y determinación del grado de introgresión en las poblaciones silvestres del NOA a partir del análisis de poblaciones simpátricas y no simpátricas de judía/poroto.
- Analizar la diversidad y propiedades físico-químicas de los suelos donde crecen las judías comerciales, silvestres y primitivas; aislamiento e identificación taxonómica de las cepas de rizobios en suelos de cultivo del NOA.
- 4. Análisis de las interacciones simbióticas rizobio-judía más eficientes para conseguir mayor rendimiento de la judía/poroto.

METODOLOGÍA

Las tareas (T) del proyecto que se describen a continuación, se corresponden con los objetivos del mismo:

T1. Germoplasma de poroto/judía del NOA

Colección de nuevas poblaciones de poroto/judía silvestre, en sitios dentro del área de distribución de la especie donde no se han colectado anteriormente. Para ello se analizará la amplitud, partición y patrones ecogeográficos de la distribución conocida de la especie, la información disponible de colectas previas, herbarios nacionales, floras regionales, citas bibliográficas y la base de datos del BANOA y de otras colecciones de germoplasma internacionales. La colección de poblaciones primitivas se realizará en los campos de los productores de la región. Se colectarán semillas de poblaciones silvestres y primitivas que se incorporarán al BANOA y se confeccionarán ejemplares de herbario como material de referencia.

T2. Estudio fenotípico, genotípico y determinación de la introgresión en la judía/poroto en el NOA

Se emplean las poblaciones silvestres y primitivas de judía/poroto de la colección conservada en el BANOA. La caracterización fenotípica, basada en los descriptores habituales, se lleva a cabo en parcelas experimentales del NOA en regiones agro-ecológicamente similares a los sitios de colección, a fin de evitar la selección natural por baja adaptación, dentro de las poblaciones. Los resultados cuantitativos se analizan mediante comparación de medias y análisis de varianza. En el estudio genotípico se analiza una muestra de 200 poblaciones de porotos silvestres y primitivos provenientes del BANOA mediante marcadores moleculares microsatélites distribuidos en todo el genoma del poroto. Se construirá un árbol filogenético basado en el algoritmo de Neighbor-Joining mediante el programa Powermarker y se realizará un análisis de coordenadas principales empleando el programa GenAlEx. El grado de introgresión se determinará mediante comparación de los datos procedentes de los análisis morfológicos

(tamaño de semilla, de vaina y caracteres de hoja) y moleculares de las poblaciones de judías nativas, silvestres y domesticadas, simpátricas y no simpátricas.

T3. Muestreo y análisis físico-químico de los suelos de cultivo de judía/poroto en el NOA; aislamiento de rizobios

El muestreo de suelos se realiza en zonas de crecimiento de judía/poroto. En el análisis físico-químico de los suelos se utilizan los métodos oficiales de análisis. El aislamiento de rizobios a partir de los nódulos de las raíces de las plantas de judía se lleva a cabo de la manera habitual. La identificación de los aislados se lleva a cabo utilizando métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen 16S rRNA se amplifica utilizando los oligonucleótidos 41f y 1488r. Para el análisis filogenético se empleará Geneious 7.1.7 y los árboles filogenéticos se inferirán usando el algoritmo neighbor-joining o de máxima homología (ML) y se visualizarán con Mega5.

T4. Análisis de las interacciones simbióticas rizobios-judía/poroto

Se utilizan variedades de judía/poroto de la colección de germoplasma del NOA conservadas en la MBG-CSIC y 10 cepas de rizobios de la EEZ-CSIC. El ensayo de las interacciones planta-rizobio se lleva a cabo en los invernaderos de la EEZ-CSIC. El contenido en N se determinará mediante digestión Kjeldahl siguiendo la metodología establecida por Brouat y Crouzet. Sobre la base de este ensayo se podrán seleccionar cepas por su capacidad de Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN).

IMPACTO DE LA COLABORACIÓN PARA ARGENTINA

Impacto para el INTA

A partir de los resultados obtenidos en este proyecto se espera obtener una visión ampliada de la diversidad genética existente en las poblaciones silvestres y domesticadas de judía/poroto del Noroeste de Argentina (centro de origen de la especie), complementando los trabajos realizados hasta el momento por los equipo de investigación participantes. Esto es relevante además para su

aplicación en el mejoramiento orientado a incorporar dicha variabilidad en las variedades comerciales de Argentina, las cuales presentan una estrecha base genética.

Impacto para RIZOBACTER

Del estudio comparativo de la biodiversidad de bacterias endosimbióticas del poroto se podrá inferir las diferencias entre las principales clases de bacterias asociadas a los distintos tipos de suelo y cultivo, lo que permitiría identificar aquellas bacterias beneficiosas para el desarrollo y crecimiento de las plantas y que podría estar en la base de la fertilidad del suelo. Tales bacterias podría utilizarse, bien de forma independiente o en consorcios bacterianos, para preparar inóculos que puedan adicionarse a los suelos que se pretendan cultivar y/o recuperar, utilizando tales bacterias para la producción de biofertilizantes para el cuidado y mejora de los suelos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España, proyecto i-COOP 2016SU0004) y del Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA, Argentina).

Actas AEL 7

VI SEMINARIO DE JUDIA

Caracterización y estudio de introgresión en poblaciones de *Phaseolus vulgaris* del NOA (silvestres y primitivas)

Mariana J. Ferreyra¹, M. Carmen Menéndez Sevillano¹, Luis IBARRa¹, Fernanda COLQUE¹, Antonio M. DE RON²

1 Estación Experimental Agropecuaria Salta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Salta, Argentina

2 Biología de Agrosistemas, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC). Pontevedra, España

Abstract

In this work we present the characterization of the *Phaseolus vulgaris L*. and *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus collection from the Germplasm Bank of Northwestern Argentina (NOA). This collection gathers 401 accessions of primitive bean populations and 221 of the wild bean form. All of them are from Northwestern Argentina. Of the total of accessions, 85% have been characterized morpho-agronomically and 25% have molecular characterization. We also present the results of the introgression studies among sympatric populations.

Keywords

Bean, characterization, gene flow, morphology, molecular variation, *Phaseolus vulgaris* L., wild populations.

Resumen

En este trabajo se presenta la caracterización de la colección de *Phaseolus vulgaris L.* y de *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus del Banco

de Germoplasma del Noroeste de Argentina (NOA). Esta colección reúne 401 entradas de poblaciones primitivas de judía o poroto común y 221 entradas de la forma silvestre, todas ellas procedentes del Noroeste de Argentina. Del total de entradas existentes, el 85% están caracterizadas morfo-agronómicamente y el 25 % molecularmente. También se presentan los resultados de los estudios de introgesión entre poblaciones simpátricas.

Palabras clave

Caracterización, flujo genético, judía, morfología, *Phaseolus vulgaris L*, poblaciones silvestres, poroto, variación molecular.

INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris L. (poroto o judía común) es entre las leguminosas de grano alimenticias una de las especies más importantes para el consumo humano y América Latina la región de mayor producción y consumo. El centro de origen del poroto común ha sido ampliamente discutido, pero a la luz de las investigaciones botánicas, bioquímicas y arqueológicas, se ha aceptado que se encuentra en el continente americano (Burkart y Brucher 1953, Kaplan 1965, Miranda Colín 1967, Gentry 1969, Brucher 1988).

Las provincias del noroeste argentino (NOA) representan el límite sur del centro Andino de domesticación vegetal (Parodi 1953). En los valles húmedos de estas provincias se menciona la presencia de la forma silvestre nativa, *Phaseolus vulgaris* (en ocasiones denominada var. *aborigineus* (Burk.) Baudet) (Burkart 1941, Brucher 1953, Burkart y Brucher 1953, Berglund-Brucher y Brucher 1976, Debouck 1986, Menéndez Sevillano y Solari 1988, Brucher 1988, Menéndez Sevillano et al. 1989) y allí donde aún se practica un sistema de agricultura primitivo basado en el maíz, las papas y los porotos (Parodi 1953, Parodi 1966, Ottonello y Lorandi 1987) pueden encontrarse una gran variedad de cultivares locales tradicionales de porotos que se han mantenido a través de los años en las huertas familiares y cuyas semillas fueron parte de la dieta de los pobladores indígenas (Ottonello y Lorandi

1987, Menéndez Sevillano 1992, Menéndez Sevillano 2002). En algunos lugares del NOA existen áreas simpátricas donde crecen la forma silvestre y la domesticada, y el flujo génico entre ambas formas da origen a poblaciones intermedias, denominándose al conjunto de estas tres entidades complejo "wild-weedy-crop" (Debouck et al. 1989, Beebe et al. 1997, Papa y Gepts 2003, Menéndez Sevillano et al. 2009).

El banco activo de recursos fitogenéticos del Noroeste Argentino (BANOA) conserva una colección consistente en 401 entradas de la forma primitiva y 221 de la forma silvestre provenientes de las provincias del NOA. Para un eficiente uso de su potencial genético, las entradas deben estar debidamente identificadas y caracterizadas a fin de estimar la variabilidad contenida en esta colección. El valor de una colección de germoplasma aumenta en función de la información que acompañe a cada una de las entradas conservadas y para ello se debe realizar la caracterización de las mismas. Del total de entradas conservadas en el BANOA, el 85% se encuentran caracterizadas morfo-agronómicamente y 25% molecularmente. Durante las colectas de germoplasma realizadas por el BANOA se han detectado poblaciones cercanas a sitios de cultivo que presentan características intermedias entre el germoplasma silvestre y el cultivado, siendo necesario caracterizar su variabilidad para evaluar la posible ocurrencia de flujo génico y sus implicancias para la conservación del acervo silvestre.

Las colecciones de germoplasma de poroto de los Centros Internacionales de Investigación han facilitado los avances mundiales en la producción agrícola, constituyendo la materia prima en los programas de mejora, así como para la restitución de formas primitivas a los pequeños agricultores de la zona que, debido al cambio de las costumbres, han ido perdiendo algunos tipos que se mantienen conservados aún en el BANOA y así contribuir a la conservación *in situ* de estas formas primitivas. En cuanto a las poblaciones de la forma silvestre, también se encuentran en peligro debido al avance de la frontera agropecuaria, las urbanizaciones y el desmonte, por lo cual la única forma de resguardar su variabilidad es a través de su colecta y conservación y contribuir a la creación de reservas genéticas para la conservación *in situ* de las poblaciones silvestres con mayor variabilidad.

El objetivo de este trabajo es presentar los avances realizados durante los últimos años en la caracterización y estudio de la colección que se mantiene en el BANOA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la caracterización morfológica de las entradas se utilizaron atributos fenológicos, vegetativos y reproductivos (tabla 1) elegidos sobre la base de los trabajos de Puerta Romero (1961), de los descriptores del IBPGR (1982) y la experiencia personal, siguiendo los criterios establecidos para determinar la cantidad de material a medir, así como para establecer la forma de registrar las mediciones.

Tabla 1.

Caracteres estudiados en el germoplasma de judía o poroto estudiado.

Caracteres vegetativos	Caracteres de la flor	Caracteres del fruto	Caracteres de la semilla	Caracteres fenológicos
Longitud y anchura del folíolo central (cm)	Color interno del estandarte y las alas de la flor	Longitud, anchura y grosor de la vaina (cm)	Longitud, anchura y grosor de la semilla (mm)	Período de germinación (días)
Forma del folíolo central (orbicular o lanceolada)	Dimensiones (mm) y forma de las bractéolas de la flor así como número de venas en las bractéolas	Nº de semillas por vaina	Forma de la semilla (índices J y H)	Período de floración (días)
Hábito de crecimiento (determinado o indeterminado)		Forma de la vaina (índice K)	Colores y patrón de distribución de los colores primario y secundario	Período de fructificación (días)
		Color de la	Peso de 100 semillas (g)	Período de
		vaina madura	Tamaño de la semilla	maduración (días)
			Rendimiento de semillas por planta (g)	

Las observaciones se realizaron en cultivos experimentales en la localidad de Cachi, Departamento de Cachi, Provincia de Salta (25° 04′ S, 66° 12′ O, 2280 msnm, precipitación anual media 190 mm). Esta región posee condiciones ecológicas similares a las de los lugares de colección de las muestras originales. Se sembraron 10-20 semillas, según la disponibilidad para cada entrada, en surcos de 7-14 m, con una distancia de 1 m entre surcos y 0,70 m entre semillas. En todos los casos las semillas fueron escarificadas y tratadas con fungicida antes de ser sembradas. Las siembras se realizaron, según los años, entre el 15 de octubre y el 15 de noviembre. Dado que todas son de crecimiento indeterminado se confeccionó un sistema de enrame, con cañas y alambres y se mantuvieron separados los surcos y las plantas por surco a fin de detectar plantas diferentes (figura 1-A y B).

Durante los meses de enero y febrero se realizaron las observaciones morfológicas sobre el cultivo referidas a características de tamaño de hoja, flor y fruto ya que, al ser todas las entradas de hábito indeterminado trepador, durante estos meses se pueden encontrar sobre las mismas entradas plantas en estado de floración y fructificación (figura 1 C, D, E, F, G y H). La cosecha se llevó a cabo durante los meses de mayo y junio.

Las vainas y semillas se llevaron al laboratorio donde se tomaron los caracteres establecidos y se recolectaron flores de cada entrada, conservándolas en FAA (formol, ácido acético y agua) para la medición de las bractéolas en el laboratorio. Las semillas obtenidas en el cultivo se secaron en cámara de secado a 5% de humedad y se conservaron en la cámara de frío del BANOA entre 2° y 5° C, previo envasado en bolsas trilaminadas y cerradas herméticamente. Las medidas de las hojas y vainas se realizaron con una regla milimetrada y las medidas de las semillas con un calibre digital. La forma del folíolo central se determinó sobre la base de la relación entre la longitud y la anchura: con valores de 1 la hoja se considera orbicular y mayor de 1 lanceolada.

Los colores de flor se determinaron de acuerdo a la carta de colores de Kornerup y Wansher (1978). También se registró en el laboratorio la longitud (L) y anchura (A) de las bractéolas con un estereomicroscopio; con la relación de estas medidas (L/A) se estableció la forma de la bractéola, como orbicular (igual a 1) y lanceoladas (mayor a 1) y se registraron el número de venas en las bractéolas. Según Vanderborght (1983) y Brüger (1988b) las entradas primitivas de bractéolas lanceoladas y con un número de nervaduras entre 5 y 9 estarían



Figura 1. Ensayos de caracterización. A: preparando el enramado; B: plantas desarrolladas; C y D: caracterizando; E, F, G y H: distintos estados fenológicos.

relacionadas a la forma silvestre andina y aquellas con bractéolas orbiculares y menor número de nervaduras a la mesoamericana.

La forma de las vainas se determinó con el índice K= grosor/anchura (Puerta Romero 1961) indicativo de la forma de la vaina, con valores de 0,5 se consideró aplanada y con valores de 1,0 redondas

La forma de las semillas, se estableció según los índices J (longitud/anchura) y H (grosor/anchura) de Puerta Romero (1961). De acuerdo al índice J de 1,16-1,42 es esférica; de 1,43-1,65 elíptica; de 1,66 a más de 2,0 oblongo (1,85 arriñonado corto; de 1,86 a 2,00 arriñonado medio y mayor de 2 arriñonado largo) y de acuerdo al índice H, menor o igual a 0,69 aplanada; de 0,70 a 0,79 semillena y mayor o igual a 0,80 llena. El peso de 100 semillas se tomó con una balanza de precisión y se clasificaron por tamaño según Singh et al. (1991): pequeñas (peso menor a 25 g), medianas (peso entre 25 y 40 g) y grandes (mayor de 40 g).

Los colores de semillas, tanto el color básico como los secundarios y terciarios distribuidos en diferentes diseños se tomaron con la carta de colores de Kornerup y Wansher (1978). La distribución de los colores secundarios y terciarios se denominaron sobre la base de los trabajos de Puerta Romero (1961) (figura 2). El color de las semillas y el patrón de distribución de los colores secundarios y terciarios así como la forma de las semillas son elementos que los pequeños agricultores utilizan para denominar los distintos tipos de porotos que cultivan.



Figura 2. A: porotos primitivos. B: porotos silvestres.

Los caracteres fenológicos se tomaron en función del número de días desde la siembra hasta completar los diferentes ciclos y de acuerdo a las normas establecidas en los estudios fenológicos.

Tanto los valores observados en el campo como los registrados en laboratorio se almacenaron en soporte informático en el programa Excel. Los caracteres estudiados se sometieron a un análisis estadístico descriptivo; para los cuantitativos se calcularon medidas de tendencia central y variabilidad. Las entradas se agruparon para cada carácter, tanto cualitativo como cuantitativo, de acuerdo a las similitudes que presentaron. Para analizar la variación de los caracteres cuantitativos se calcularon las medias generales, el coeficiente de variación y la desviación típica. Para los caracteres cualitativos se analizó la variación por medio de histogramas.

Para evaluar la ocurrencia de flujo génico entre poblaciones silvestres y cultivadas se seleccionaron y clasificaron poblaciones atendiendo a si se encontraban cerca (< 1km), a distancia intermedia (> 2km) o alejadas (> 5km) de zonas de cultivo de poroto (tabla 2).

Se realizó la extracción de ADN a partir de plántulas mediante protocolo CTAB (Bornet y Branchard 2001) de 10 individuos por población. El ADN se amplificó mediante PCR empleando 4 primers microsatélites (SSR, simple sequence repeat) (tabla 3). Los fragmentos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida 10% y se tiñeron con GelRed™. Con los patrones de bandas obtenidos se generó una matriz y se analizaron las frecuencias alélicas por marcador en el programa PowerMarker v3.25. Para el análisis de los datos se compararon las frecuencias alélicas entre las poblaciones y se agregaron al análisis los patrones de bandas de diferentes variedades comerciales de porotos andinos (Alubia y Paloma) y mesoamericanos (NAG12 y Leales15) que se cultivan en la zona.

Tabla 2.

Entradas de poroto silvestre del BANOA analizadas empleando marcadores microsatélites (SSR).

			· ,	
Entrada	Sitio	Departamento	Provincia	Distancia a zonas de cultivo de poroto
MCM405	El Infiernillo	Chicoana	Salta	Cerca (0,9 km)
MCM399	Escoipe	Chicoana	Salta	Cerca (0,2 km)

Entrada	Sitio	Departamento	Provincia	Distancia a zonas de cultivo de poroto
MCM400	Escoipe	Chicoana	Salta	Intermedia (3,0 km)
MCM401	Escoipe	Chicoana	Salta	Intermedia (3,5 km)
MCM407	Yala	M. Belgrano	Jujuy	Alejada (>5,0 km)
MCM411	Yala	M. Belgrano	Jujuy	Alejada (>5,0 km)

Tabla 3.

Primers SSR utilizados para el análisis de polimorfismos entre 6 entradas de poroto silvestre. Se indica grupo de ligamiento (GL), secuencia (F: Forward, R: Reverse) y temperatura de hibridación (t°).

GL	Nombre	Secuencia 5´- 3´	t°
GL1	BM157	F: ACT TAA CAA GGA ATA GCC ACA CA	60°C
		R: GTT AAT TGT TTC CAA TAT CAA CCT G	
GL 2	GATS91	F: GAG TGC GGA AGC GAG TAG AG	60°C
		R: TCC GTG TTC CTC TGT CTG TG	
GL9	PV-at007	F: AGT TAA ATT ATA CGA GGT TAG CCT AAA TC	57,2°C
		R: CAT TCC CTT CAC ACA TTC ACC G	
GL 11	PV-ag001	F: CAA TCC TCT CTC TCT CAT TTC CAA TC	57,2°C
		R: GAC CTT GAA GTC GGT GTC GTT T	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las poblaciones primitivas se comportaron como anuales, de hábito indeterminado y con un período de emergencia de alrededor de 12 d, alcanzaron plena floración entre los 84 y 107 d, plena fructificación entre los 102 y 104 d llegando a madurez total entre los 152 y 179 d (todos los valores fueron considerados a partir de la fecha de siembra).

La longitud del folíolo central de la hoja trifoliolada varió entre 4,9 cm y 8,7 cm y la anchura entre 2,9 cm y 5,6 cm, resultando la mayoría de forma lanceo-

lada. Tanto la cara interna del estandarte, como las alas de la flor presentaron color blanco y distintos tonos de violeta, púrpura, lila, lila rojizo y rosa purpúreo. La longitud de las bractéolas de la flor osciló entre 1,9 mm y 6,0 mm y la anchura entre 1,3 mm y 3,7 mm. De acuerdo a la relación entre estos valores la mayoría de las entradas estudiadas tienen bractéolas lanceoladas y con más de 8 nervaduras, lo que indicaría su relación con la forma silvestre andina.

En la mayoría de las entradas el color del pericarpio de las vainas maduras fue amarillo claro, algunas presentaron algún tipo de diseño sobre el color primario representado por estrías de distinto grosor o intensidad, en un color más oscuro: púrpura grisáceo o pardo grisáceo. Su longitud varió entre 8,9 cm y 13,3 cm, su anchura entre 0,70 cm a 0,96 cm y su grosor de 0,45 cm a 0,72 cm. El número de semillas por vaina estuvo entre 4 y 7, y con respecto a la forma según el índice K (Puerta Romero 1961) redondas.

El tegumento de las semillas presentó los colores: negro, blanco y distintas gamas de rojo, amarillo, ocre, marrón claro y amarillo, en algunos casos con uno o dos colores adicionales, color secundario y terciario, distribuidos formando diversos diseños sobre el color primario: alrededor del hilo, alrededor del hilo y extendiéndose hacia el resto de la semilla, bicolores punteadas, formando estrías y punteado difuso. Los colores secundarios y terciarios variaron en distintas gamas de rojo amarillo ocre, marrón claro y negro. La forma de la semilla según el índice J (Puerta Romero 1961) presentó distintas proporciones de esférica, oblonga y elíptica, siendo la más común esta última. La forma según el índice J (Puerta Romero 1961) presentó distintas proporciones de aplanada y semillena, siendo la mayoría semillena. Las dimensiones de las semillas variaron entre 0,99 cm y 1,73 cm de longitud, 0,65 cm y 1,10 cm de anchura y 0,36 cm a 0,76 cm de grosor, variando el peso de 100 semillas entre 22 g y 67 g. En función del peso de 100 semillas según Singh et al. (1991), el tamaño de la mayoría está por encima de 40 g por lo que se consideraron semillas grandes, confirmando su pertenencia al centro andino de domesticación. En todas las entradas el color del hilo fue blanco y el tegumento brillante. El número de vainas por planta varió entre 16 y 385 y el rendimiento por planta entre 61 y 367 g.

Todas las entradas de las poblaciones silvestres se comportaron como anuales y de hábito trepador, sus características fueron más uniformes que en las primitivas, con un ciclo muy largo entre 120 y 180 d.

El tamaño de semilla varió entre 7,1 mm y 8,7 mm en la longitud, 4,6 mm y 5,9 mm en la anchura y 2,5 mm y 3,7 mm en el grosor. La forma de la semilla fue elíptica en la mayoría de las entradas (según el índice J de Puerta Romero) y aplanadas (según el índice H de Puerta Romero) y el peso de 100 semillas estuvo entre 9 g y 15 g. Por otro lado, el tegumento de las semillas de la formas silvestres es muy uniforme, ya que todas presentaron un color primario amarillo ocre, con moteado y estrías en color oscuro.

La longitud del folíolo central varió entre 5 cm y 9 cm y la anchura entre 1,6 y 6,3 cm. Todas las entradas presentaron el folíolo central de la hoja trifoliolada de forma lanceolada.

Respecto a la flor, en todas las entradas silvestres el color del estandarte estuvo dentro de la gama de los púrpura y en las alas predominó el color purpura y distintos tonos de lila. La forma de las bractéolas fue lanceolada, con un número de venas entre 8 y 9.

Con respecto a las vainas, en las poblaciones silvestres todas fueron de color crema con estrías púrpura en la madurez. La longitud varió entre 5,7 cm y 9,0 cm, la anchura entre 0,4 cm y 0,9 cm y el grosor entre 0,37 cm y 0,64 cm. En cuanto al número de semillas por vaina varió entre 4 y 6 semillas y todas las vainas resultaron redondas. El número de vainas por planta varió entre 8 y 540 y el rendimiento por planta entre 19 y 211 g.

Con respecto a la caracterización con microsatélites para evaluar el flujo génico, las poblaciones analizadas mostraron diferencias en las frecuencias alélicas de los distintos marcadores. Se observó un promedio de 4,5 alelos por locus. El 44% de los marcadores estuvo presente sólo en las variedades cultivadas y un 39% sólo en las poblaciones silvestres (figura 3). Se observó que en algunos marcadores existe correlación entre la frecuencia alélica y la cercanía a los cultivos. Los alelos 4 y 12 estuvieron presentes en las poblaciones silvestres alejadas, pero ausentes tanto en las variedades comerciales como en las poblaciones silvestres cercanas a los cultivos.

CONCLUSIONES

Con este estudio se cumplió con el objetivo preliminar de la caracterización, el cual consiste en disponer de la descripción de las entradas, de la variabilidad

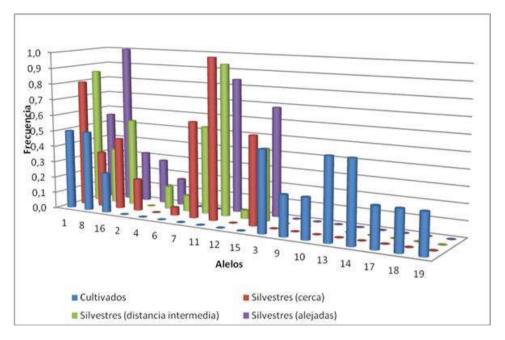


Figura 3. Frecuencia de alelos en los cuatro loci analizados.

existente y del agrupamiento de las mismas por caracteres afines. Esto facilita la elección de las entradas en función de sus características específicas para los mejoradores, investigadores o para quienes tengan interés en el uso del germoplasma. La caracterización morfológica y molecular indicó que existe gran variabilidad en los materiales conservados y un importante grado de introgresión en las poblaciones silvestres a partir del material cultivado. Aunque los complejos "wild-weedy-crop" generan una nueva variabilidad, los resultados sugieren que debido a la existencia de flujo génico entre poblaciones silvestres y domesticadas se estaría afectando la variabilidad genética original de las poblaciones de porotos silvestres. Esto alerta sobre la importancia de la conservación de las poblaciones silvestres tanto en bancos de germoplasma como en sus ambientes naturales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBA) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) el apoyo recibido a través de los

diferentes proyectos de investigación otorgados a lo largo de las investigaciones realizadas y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España, proyecto i-COOP 2016SU0004).

BIBLIOGRAFÍA

- BEEBE S, TORO O, GONZÁLEZ A, CHACÓN M, DEBOUCK D. 1997. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding. Genet. Res. Crop Evol. 44: 73-91.
- BERGLUND-BRUCHER O, BRUCHER H. 1976. The South american wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Econ. Bot. 30: 257-272.
- BORNET B, BRANCHARD M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeats (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 209-215.
- BRUCHER EH. 1953. La importancia de las altas montañas como genocentros de las plantas cultivadas y como fuentes de genes de resistencia. Ciencia e Investigación 9: 195-204.
- BRUCHER H. 1988. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in south America. <u>En</u>: Gepts P (ed) Genetic resources of *Phaseolus* beans. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- BURKART A. 1941. Sobre la existencia de razas silvestres de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus lunatus* en el norte argentino. Rev. Arg. Agron. 8: 52.
- BURKART A, BRUCHER H. 1953. *Phaseolus aborigineus* Burk. Diemutmasseliche andine Stammform del Kultubhone. Zuchter 23: 65-72.
- DEBOUCK DG. 1986. *Phaseolus* germplasm collection in Northwestern Argentina. Trip Report. IBPGR 86.
- DEBOUCK D, FLORES M, ARIOLA O, TOHME J. 1989. Presence of wild-weed-crop complex in *Phaseolus vulgaris* L. in Perú. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 32: 64-65.
- GENTRY, H.S. 1969. Origin of the common bean *Phaseolus vulgaris*. Econ Bot. 23: 55-69

- IBPGR.International Board for Plant Genet-ic Resources. 1982. Descriptor for *Phaseolus vulgaris* AGPR: International Board for Plant Genetic Resources 81.
- KAPLAN L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). Econ. Bot. 19: 358-368.
- KORNERUP A, WANSHER JH. 1978. Methuen handbook of colour. Third edition Eyre Methuen-London.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC, SOLARI R. 1988. Caracterización de una población de porotos (*Phaseolus vulgaris* L.) indígenas de Iruya, noroeste de Argentina. Memoria del VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos. Quito-Ecuador.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC, PALACIOS R, ZALLOCCHI EM y BRIZUELA MM. 1989. XXII Jornadas Argentinas de Botánica. Córdoba.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC. 1992. Germoplasma de *Phaseolus vulgaris* L. colecciones de cultivares primitivos y formas silvestres de Argentina. Congreso Etnobotánica-92. Córdoba, España.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC. 2002. Estudio y conservación del germoplasma silvestre y primitivo de *Phaseolus vulgaris* L. en el Noroeste de Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC, FERREYRA M, SÜHRING S, IBARRA L, MOLAS M. 2009. Flujo génico en poblaciones de poroto silvestre (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) del noroeste argentino. XXXII Jornadas Argentinas de Botánica. Córdoba, Argentina.
- MIRANDA COLIN S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* (Frijol común). Agrociencia 1: 99-109.
- OTTONELLO MM, LORANDI AM. 1987. Introducción a la arqueología y etnología argentina: 1000 años de historia argentina. EUDEBA, Buenos Aires.
- PAPA R, GEPTS P. 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. Theor. Appl. Genet. 106: 239-250.
- PARODI LR. 1953. Relaciones de la agricultura prehispánica con la agricultura actual. An. Acad. Nac. Agron. Vet. B. As. 1: 115-167.
- PARODI LR. 1966. La agricultura aborigen en la Argentina. EUDEBA, Buenos Aires.

- PUERTA ROMERO J. 1961. Variedades de judía cultivadas en España. Nueva clasificación de la especie *Phaseolus vulgaris* L. Savi. Monografías INIA 11. Madrid.
- SINGH SP. 1991. Bean genetics. En: van Schoohoven A, Voysest O (eds.) Common beans: Research for crop improvement: 199-286. CAB It., Wallingford, U. K. y CIAT, Cali, Colombia.
- VANDERBORGHT T. 1983. Evaluation of *P. vulgaris* wild types and woody forms. Plant Genet. Resour. Newsl. 54: 18-24.

Actas AEL 7

VI SEMINARIO DE JUDIA

Efecto del nitrato y el encharcamiento en la emisión del gas invernadero N₂O por la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli*

Alba HIDALGO-GARCÍA, Germán TORTOSA, Eulogio J. BEDMAR, María J. DELGADO

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC), Granada, España.

Abstract

Nitrous oxide (N₂O) is a powerful greenhouse gas and a major cause of ozone layer depletion. More than 60% of global N₂O emissions come from agricultural soils mainly due to the application of synthetic N-containing fertilizers that are converted into N₂O by microbiological processes, mainly nitrification and denitrification. Biological nitrogen fixation by rhizobia symbiotically associated with legumes is an economical and environmentally friendly alternative to increase soil fertility and crop yield without adding nitrogen fertilizers and, therefore, contribute to mitigate N₂O emissions. However, legume crops also produce N₂O indirectly by the input of N-rich residues and directly through denitrification carried out by some rhizobia under free living conditions and in symbiotic association with legumes. In this work, the effect of nitrate and flooding on N₂O emission by nodulated roots of common beans (Phaseolus vulgaris) has been investigated. Our results showed that, as it was previously reported for the model symbiosis Glycine max-Bradyrhizobium diazoefficiens, the presence of nitrate in the plant mineral solution induced N₂O emission. However, in contrast to soybean response, flooding did not increase N2O production by nodulated roots of common beans. Since flooding had a significant negative effect on plant and nodule physiology, we suggest that this environmental stress does not induce N₂O emissions due to the high sensitivity of the *Phaseolus* vulgaris-R. etli CFN42 symbiosis to flooding.

Keywords

Denitrification, flooding, N₂O, nitrate, *Phaseolus vulgaris, Rhizo-bium etli*.

Resumen

El óxido nitroso (N,O) es un potente gas de efecto invernadero y un agente causante de la destrucción de la capa de ozono. Más del 60% de la emisión total de este gas proviene de la agricultura debido a la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen sintético, que se convierten en N₂O mediante procesos microbianos, principalmente nitrificación y desnitrificación. La fijación biológica de nitrógeno por la simbiosis entre plantas leguminosas y rizobios es una alternativa económica, y respetuosa con el medio ambiente, para incrementar la fertilidad de los suelos y la productividad de los cultivos sin necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados y, por tanto, contribuir a mitigar la emisión de N₂O. Sin embargo, el cultivo de leguminosas también puede contribuir a la emisión de N₂O, indirectamente por el aporte de residuos ricos en nitrógeno al suelo y directamente mediante la desnitrificación que llevan a cabo algunos rizobios, tanto en vida libre como asociados simbióticamente con las leguminosas. En este trabajo se ha investigado la implicación del nitrato y el encharcamiento en la emisión de N₂O por las nódulos de plantas de judía (Phaseolus vulgaris). Los resultados indican que la presencia de nitrato en la solución mineral de las plantas indujo la emisión de N₂O y que encharcamiento no incrementó la producción de N₃O. Dado que el encharcamiento tuvo un efecto negativo sobre la fisiología de las plantas y de los nódulos, sugerimos que este estrés ambiental no induce la emisión de N₃O debido a la elevada sensibilidad de la simbiosis *Phaseolus vulgaris-R*. etli al encharcamiento.

Palabras clave

Desnitrificación, encharcamiento, N₂O, nitrato, *Phaseolus vulgaris, Rhizobium etli*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los gases invernadero que se consideran más peligrosos según el protocolo de Kyoto son el dióxido de carbono (CO_2) , metano (CH_4) , óxido nitroso (N_2O) , compuestos hidrofluorocarbonados (HFC), productos perfluorocarbonados (PFC) y el hexafluoruro de azufre (SF $_6$). Según el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) se estima que los tres primeros contribuyen en un 50%, 18% y 10%, respectivamente, al efecto global del calentamiento mundial derivado de actividades humanas (IPCC 2001, 2006). El N_2O es un potente gas invernadero (GEI) debido a su alta capacidad radiativa, 298 veces mayor que la del CO_2 y, además, es el compuesto que contribuye en mayor medida a la destrucción de ozono estratosférico (Ravinshakara et al. 2009). Se estima que, aproximadamente, el 60% de la emisión de este gas procede de la agricultura (Smith et al. 2008) debido, en gran medida, a la aplicación de fertilizantes nitrogenados al suelo, siendo los procesos de nitrificación y desnitrificación, que realizan los microorganismos del suelo, los que más contribuyen a la emisión de N_2O por los suelos agrícolas (Thompson et al. 2012).

Una estrategia para reducir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados, y, por tanto, para mitigar la emisión de $\rm N_2O$ por los suelos agrícolas, es potenciar la inoculación de los cultivos de leguminosas con rizobios fijadores de nitrógeno, una forma económica y respetuosa con el medio ambiente de aumentar la calidad nutricional del suelo. Sin embargo, el cultivo de leguminosas también contribuye a la emisión de $\rm N_2O$ mediante el aporte de residuos ricos en nitrógeno (Baggs et al. 2000), así como directamente debido a la capacidad que tienen algunos rizobios de desnitrificar tanto en vida libre como asociados simbióticamente a las leguminosas (Mesa et al. 2004, Bedmar et al. 2005, Bedmar et al. 2013, Torres et al. 2016).

La desnitrificación es el proceso por el que el nitrato (NO_3^-), en condiciones de limitación de oxígeno, se reduce de manera secuencial a nitrógeno molecular (N_2) vía la formación de nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) (Zumft 1997), que llevan a cabo las enzimas nitrato reductasa (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). La mayoría de los rizobios no poseen todos los genes de la desnitrificación, por lo

que pueden producir NO y N₂O tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis con su planta leguminosa hospedadora.

La judía (*Phaseolus vulgaris*) es un leguminosa ampliamente utilizada en nutrición humana y animal y forma simbiosis fijadora de N_2 con unas 15 especies de rizobios (Shamseldin et al. 2017). Entre ellos, la especie *Rhizobium etli* se utiliza en numerosas zonas agrícolas como su microsimbionte habitual. Sin embargo, *R. etli* carece de las proteínas NapA y NosZ (Gómez-Hernández et al. 2011), por lo que la ausencia de esta última proteína podría resultar en la emisión de N_2 O a la atmósfera. Puesto que se desconoce la capacidad de los nódulos de las plantas de judía para producir este GEI, el objetivo de este trabajo ha sido determinar si las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* CFN42 son capaces o no de emitir N_2 O a la atmósfera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inoculación de plantas de judía y cultivo de las plantas

Se ha utilizado R. etli CFN42 (Quinto et al. 1982) para inocular plántulas de P. vulgaris var. Negro Jamapa. Para el crecimiento rutinario de la bacteria se utilizó medio TY suplementado con 20 µg/ml de ácido nalidíxico a 30° C. Las semillas de judía se esterilizaron en superficie mediante lavado con etanol absoluto durante 30 s, inmersión en H₂O₂ 10 min y 5 enjuagues con agua estéril. Posteriormente se mantuvieron en imbibición durante 2 h y, a continuación, se colocaron en placas Petri que contenían agar al 1%. Las placas se guardaron en oscuridad durante 72 h a 30° C. Las semillas germinadas se plantaron en jarras Leonard rellenas de vermiculita en su parte superior y de la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975) en su parte inferior. En algunos casos, la solución mineral se suplementó con 2 ó 4 mM de KNO₃. En el momento de la siembra, cada planta se inoculó con 1 ml de una suspensión bacteriana (108 células/ml) y se colocaron en una cámara provista de condiciones controladas de luz (16/8 h día/noche) y temperatura (28/20° C día/noche), y una intensidad luminosa de 180 μmoles de fotones m² s⁻¹. A los 24 d de cultivo, una serie de plantas se sometió a encharcamiento durante 2 ó 7 días mediante inmersión de la maceta en solución nutritiva con o sin nitrato dependiendo del tratamiento.

Determinación de la emisión de N₂O por raíces noduladas

Las plantas se sacaron de las macetas, se eliminó la vermiculita, y se colocaron en frascos de 100 ml de capacidad que contenían 25 ml de solución mineral suplementada o no con nitrato. Los frascos se cierran con un tapón de caucho perforado al que se ajusta el tallo de la planta y se sella con silicona, de manera que el sistema radicular queda cerrado herméticamente (Tortosa et al. 2015). A las 2 h, 5 h y 8 h se tomaron alícuotas de 250 μ l del interior de los frascos que se emplearon para inyectarlas en un cromatógrafo HP 4890D equipado con un detector de captura electrónica (ECD) y una columna Porapak Q (80/100 mesh). Como gas portador se empleó N_2 a un flujo de 30 ml/minuto. Las temperaturas del inyector, la columna y el detector fueron 125° C, 60° C y 375° C, respectivamente. La concentración de N_2 O se calculó empleando óxido nitroso puro al 2% (v/v). Para calcular la concentración de N_2 O se tuvo en cuenta el disuelto en la solución, que se estimó mediante el coeficiente de Bunsen de solubilidad en agua (54,4% a 25° C). La tasa de emisión de N_2 O se calculó en el intervalo lineal de producción entre 2 h y 8 h.

Determinación de la biomasa vegetal

El peso seco de las plantas se determinó tras el secado de la parte aérea en una estufa a 60° C durante 72 h.

Determinación de leghemoglobina en los nódulos

La determinación se hizo según La Rue y Child (1979). Para ello, los nódulos (0,4 g) se homogeneizaron con 6 ml del tampón de extracción ($Na_2HPO_4x 2H_2O/NaH_2PO_4x H_2O, 50$ mM, pH 7,4; [$K_3Fe(CN)_6$] (0,02 % y $NaH_2CO_3 0,1$ %) suplementado con 0.1 g de polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP). El homogenado se centrifugó a 4° C durante 20 min a 12000 g y 50 μ l del sobrenadante se mezcló con 3.15 ml de una solución saturada de ácido oxálico en tubos de cristal de 17 ml con tapón de rosca, los cuales se autoclavaron durante 30 minutos a 120° C. Tras el autoclavado, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La fluorescencia de las soluciones se determinó usando un espectrofluorímetro equipado con una lámpara xenón-mercurio y un fotomultiplicador sensible al

rojo, RF-540. La longitud de onda de excitación fue de 405 nm y la de emisión de 600 nm. La diferencia de fluorescencia entre las muestras autoclavadas y las no autoclavadas (controles) fue proporcional al contenido de leghemoglobina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del nitrato sobre la emisión de N₃O por raíces noduladas

No se detectó N_2O en las plantas sin tratar con KNO_3 , mientras que aquellas que se regaron con 2 y 4 mM de NO_3 mostraron una tasa de emisión en torno a 140 nmoles de N_2O por planta x hora, independientemente de la concentración de NO_3 en la solución mineral (Figura 1). El peso seco de las plantas que se regaron con solución sin nitrato fue significativamente menor que el de las plantas regadas con 2 y 4 mM de KNO_3 , y no se detectó diferencias entre los tratamientos con nitrato (Figura 2).

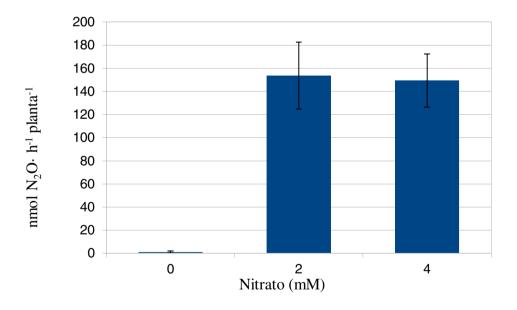


Figura 1. Efecto del nitrato sobre la tasa de emisión de N₂O por raíces noduladas de judía inoculadas con *R. etli* CFN42. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 10 réplicas correspondientes a dos experimentos independientes.

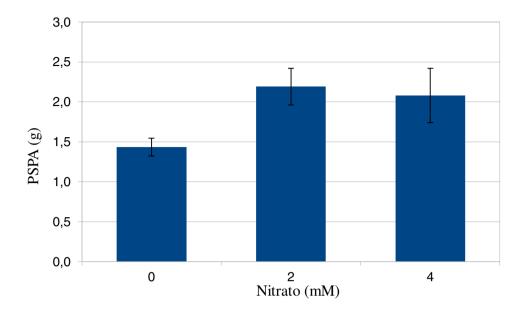


Figura 2. Efecto del nitrato sobre el peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de judía inoculadas con *R. etli* CFN42. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 10 réplicas correspondientes a dos experimentos independientes.

Que la presencia de nitrato incrementa la emisión de N_2O en la simbiosis *Phaseolus-R.etli* también se ha observado en zonas agrícolas de México donde la aplicación de urea al suelo sembrado con judía incrementó la emisión de N_2O significativamente comparado con el suelo sin tratar (Fernández-Luqueño et al. 2009). Estos hechos ponen de manifiesto la relevancia de controlar los niveles de fertilizantes nitrogenados que se aplican a los suelos agrícolas para tratar de mitigar la emisión de este potente GEI.

Efecto del encharcamiento en la emisión de N₂O por las raíces noduladas

No se observaron diferencias en la emisión de N₂O entre plantas sometidas a encharcamiento tratadas o no durante 7 días con 4 mM de KNO₃. Estos resultados difieren de los obtenidos en plantas de soja donde sí se observó un incremento significativo de la emisión de N₂O en respuesta a encharcamiento (Tortosa et al. 2015). En la Figura 3 se muestra el aspecto de una planta al co-

mienzo y al final del periodo de encharcamiento, donde se puede constatar el marchitamiento y la clorosis que sufren las plantas, síntomas típicos de leguminosas expuestas a situaciones de estrés (Latdawan 1993).

Con objeto de encontrar un tratamiento que indujera la producción de $\rm N_2O$ pero no afectara a la fisiología de la judía se realizó un segundo experimento en el que el tiempo de encharcamiento se redujo a 2 días. En este caso, tampoco se detectaron diferencias en la emisión de $\rm N_2O$ entre las plantas tratadas o no con nitrato.

Sin embargo el aspecto de las plantas, así como su peso seco, no se afectó por el encharcamiento (Figura 4). No obstante, los nódulos de las plantas encharcadas durante 2 días mostraron un color blanquecino en contraste con el color rojizo típico de los nódulos activos. De hecho, cuando se determinó la concentración de leghemoglobina de los nódulos como parámetro indicativo de la funcionalidad de los mismos se observó un descenso significativo de la misma en los nódulos de plantas encharcadas respecto a los nódulos de plantas control (Figura 5). Otros estudios han demostrado una reducción del 60% en el crecimiento de leguminosas en condiciones de encharcamiento (Wright et al. 2017), lo que sugiere una notable sensibilidad de *Phaseolus* a la hipoxia debida al encharcamiento



Figura 3. Aspecto de una planta de judía antes del encharcamiento (Control) y después de 7 de encharcamiento (E. 7 días)

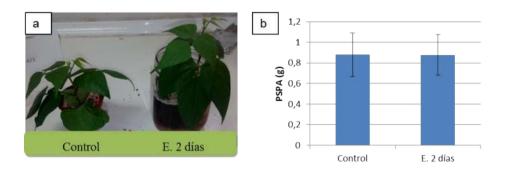


Figura 4. Efecto de 2 días de encharcamiento sobre el aspecto de las plantas de judía (a) y sobre el peso seco de la parte aérea (PSPA) de las plantas (b). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 10 plantas correspondientes a 2 experimentos independientes. Las plantas se regaron con 4 mM NO₃⁻ a lo largo de todo el ensayo y en el día 24 después de la siembra se dividieron en dos grupos, uno se regó normalmente (Control) y otro se sometió a encharcamiento durante dos días (E. 2 días).

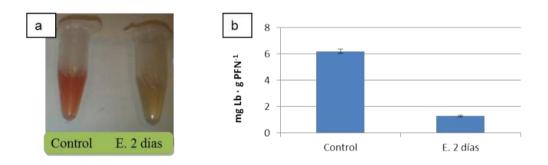


Figura 5. Efecto del encharcamiento de 2 días sobre el color (a) y el contenido en leghemoglobina del extracto citosólico vegetal de los nódulos (b). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media de 6 réplicas correspondientes a 2 extracciones independientes. Las plantas se regaron con 4 mM NO₃ a lo largo de todo el ensayo y en el día 24 después de la siembra se dividieron en dos grupos, uno se regó normalmente (Control) y otro se sometió a encharcamiento durante dos días (E. 2 días).

CONCLUSIONES

En contraste con la soja en la que el nitrato y el encharcamiento inducen la emisión de $\rm N_2O$ por los nódulos (Tortosa et al. 2015), las plantas de judía responden al tratamiento con nitrato y no al encharcamiento. El deterioro que origina la hipoxia debido al encharcamiento descarta que este factor ambiental esté involucrado en la emisión a la atmósfera de elevadas tasas de $\rm N_2O$ por las plantas de judía.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos AGL2013-45087-R del MINECO y PE2012-AGR1968 de la Junta de Andalucía cofinanciados con fondos FEDER. También agradecemos el continuo apoyo de la Junta de Andalucía al grupo BIO275.

BIBLIOGRAFÍA

- BAGGS EM, REES RM, SMITH KA, VINTEN AJA. 2000. Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. Soil Use Manag. 16:82-87.
- Fernández-Luqueño F, Reyes-Varela V, Martínez-Suárez C, Reynoso-Keller R, Méndez-Bautista J, Ruiz-Romero E, López-Valdez F, Luna-Guido M, Dendoven L. 2009. Emission of ${\rm CO_2}$ and ${\rm N_2O}$ from soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) fertilized with different N sources. Sci. Total Environ. 407: 4289–4296.
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ N, REYES-GONZÁLEZ A, SÁNCHEZ C, MORA Y, DELGADO MJ, GIRARD L. 2011. Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*. MPMI 24 (2): 233-245.
- IPCC. 2001. Climate Change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (eds.). Cambridge Univ. Press, New York.
- IPCC. 2006. IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Institute for Global Environmental Strategies (IGES) for the IPCC. Kanagawa, Japan.

- LARUE TA, CHILD JJ. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghaemoglobin. Anal. Biochem. 92: 11-15.
- LATDAWAN K. 1993. Effect of waterlogging on six summer grain legumes in Australia. Thai. J. Soils Fertilizers 15(1): 35-41.
- QUINTO C, De La Vega H, Flores M, Fernández L, Ballado T, Soberón G, Palacios R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299: 724-726.
- RAVINSHAKARA AR, DANIEL JS, PORTMANN RW. 2009. Nitrous oxide (N_2O): the dominant ozone depleting substance emitted in the 21st Century. Science, 326 (5949): 123-125
- RIGAUD J, PUPPO A. 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. J. Gen. Bacteriol. 88: 223-228.
- SMITH P. 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 363:789–813.
- THOMPSON AJ, GIANNOPOULOS G, PRETTY J, BAGGS EM, RICHARDSON DJ. 2012. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 367: 1157-1168.
- TORTOSA G, HIDALGO A, SALAS A, BEDMAR EJ, MESA S, DELGADO MJ. 2015. Nitrate and flooding induce $\rm N_2O$ emissions from soybean nodules. Symbiosis 67: 125-133.
- TRUNG BC, YOSHIDA S. 1983. Improvement of Leonard jar assembly for screening of effective rhizobium. Soil Sci. Plant Nutr. 29(1): 97-100.
- WRIGHT AJ, DE KROON H, VISSER EJW, BUCHMANN T, EBELING A, EISENHAUER N, FISCHER C, HILDEBRANDT A, RAVENEK J, ROSCHER C, WEIGELT A, WEISSER W, VOESENEK LACJ, MOMMER L. 2017. Plants are less negatively affected by flooding when growing in species-rich plant communities. New Phytol. 213: 645-656.
- ZUMFT WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol. Biol. Rev. 61(4): 533-616.

Actas AEL 7

VI SEMINARIO DE JUDIA

Colección de poblaciones de *Phaseolus vulgaris* del NOA (silvestres y primitivas)

M. Carmen Menéndez Sevillano¹, Mariana J. Ferreyra¹, Luis IBARRa¹,
Antonio M. De Ron²

- Estación Experimental Agropecuaria Salta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
 Salta, Argentina
 - Biología de Agrosistemas, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones
 Científicas (MBG-CSIC). Pontevedra, España

Abstract

The Active Bank of Northwestern Argentina (BANOA) from the INTA Salta Experimental Station conserves a seed collection of primitive populations of *Phaseolus vulgaris* L. and its wild relative. This collection consists of 401 accessions of the primitive form and 221 of the wild form. These seeds were obtained on expeditions carried out in the provinces of Northwestern Argentina (NOA) since 1986 to date.

Keywords

Collection, common bean, in situ conservation, Phaseolus vulgaris, wild bean.

Resumen

En el Banco Activo del Noroeste Argentino (BANOA) de la Estación Experimental del INTA de la provincia de Salta se conservan semillas de poblaciones primitivas de *Phaseolus vulgaris* L. y su pariente silvestre. La colección consta de 401 entradas de la forma primitiva y 221 de la forma silvestre. Estas semillas se obtuvieron en expediciones realizadas en las

provincias del Noroeste de Argentina (NOA) desde el año 1986 hasta la fecha.

Palabras clave

Colección, conservación *in situ,* judía, *Phaseolus vulgaris* L., poroto común, poroto silvestre.

INTRODUCCIÓN

Las provincias del Noroeste Argentino (NOA) representan el límite sur del centro Andino de domesticación vegetal. La forma silvestre del poroto o judía común se encuentra en los valles húmedos de la Cordillera Oriental de los Andes, creciendo entre los 700 y 2600 msnm de altitud y entre 22° y 27° S y 66° 30′ y 63° 00′ O (Parodi 1953, 1935, 1966, Burkart y Brucher 1953, Berglund-Brucher y Brucher 1976, Debouck 1986a, Brucher 1988a, Toro et al. 1990, Menéndez Sevillano et al. 1998, Menéndez Sevillano 2002). En los valles altos de esta misma región, se cultivan una gran variedad de cultivares locales tradicionales (landraces).

La colección sistemática de semillas del genero *Phaseolus* para su conservación se inició en 1986 desde el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos "N.I. Vavilov" de la Cátedra de Botánica de la Universidad de Buenos Aires, continuando a partir de 2004 desde el Banco Activo de Recursos Fitogenéticos de la Estación Experimental INTA-Salta. En el año 2006 se inició en el INTA la conservación *in situ* del pariente silvestre del poroto.

El objetivo de este trabajo es presentar las prospecciones y colecciones realizadas en las provincias del NOA y la cantidad de entradas de poroto/judía de formas primitivas y silvestres obtenidas en los distintos sitios visitados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales objeto fueron las poblaciones de porotos primitivos que siguen cultivando los pequeños productores y su pariente silvestre que se encuentra en ambientes naturales de la Argentina. Se recorrieron las Provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, San Luis y Córdoba entre los 500 y 3000 msnm



Figura 1. Zona de colección y posición de poblaciones de conservación in situ.

y entre los 22 y 34° S y 65 y 67° O (figura 1). Los sitios de colección de los porotos primitivos fueron los campos de los agricultores del NOA. La información para elegir estos sitios se basó en colecciones previas y la revisión de trabajos sobre etnohistoria (Canals Frau 1940, , Maàquez Miranda 1945, Otonello y Lorandi 1987) en los que puede recopilarse información sobre los antiguos pobladores y sus costumbres alimenticias, así como trabajos arqueológicos que ofrecen datos sobre restos vegetales encontrados en la región (Kaplan, 1981) (figura 2).



Figura 2. Coleccionando poblaciones de poroto primitivo.

En el caso de las poblaciones silvestres, previo a las colectas, se realizó un análisis detallado de la amplitud, partición y patrones ecogeográficos sobre la base de la distribución conocida de la especie. Considerando esta información y la de colectas previas, herbarios nacionales, floras regionales y citas bibliográficas se realizaron las prospecciones (figura 3). A partir del año 2006 se identificaron poblaciones de la forma silvestre a fin de seleccionar aquellas que reunieran las condiciones para su conservación *in situ* (figura 4).



Figura 3. Coleccionando poblaciones de poroto silvestre.



Figura 4. Marcando poblaciones de poroto silvestres para conservación in situ.

En ambos casos se utilizaron los mapas topográficos del Instituto Geográfico Militar (1:250.000), mapas de rutas así como catastrales.

Se registraron datos de latitud, longitud y altitud, que se obtuvieron con un sistema de posicionamiento global (GPS). Se coleccionaron vainas y semillas y,

cuando fue posible, se confeccionaron ejemplares de herbario, como material de referencia que se incorporó al herbario del Banco Activo del Noroeste Argentino (BANOA). Para registrar la información en cada sitio se utilizó el formulario de colecta del Banco y la información se incorporó en la base de datos DBGERMO (Base de Datos del INTA). Las semillas se secaron en cámara de secado hasta un 5% de humedad, se colocaron en bolsas trilaminadas cerradas herméticamente y se almacenaron en la cámara de frío del BANOA entre 2 y 5° C para su conservación (figura 5).



Figura 5. Entradas conservadas en la cámara de frío del BANOA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de las expediciones en el NOA se reunieron 401 entradas de porotos primitivos y 221 de la forma silvestre (tablas 1 y 2 y figura 6). Para su conservación *in situ* se identificaron 67 poblaciones en 3 provincias y 8 sitios en diferentes regiones ecológicas del NOA, las que se monitorean periódicamente (tabla 3).

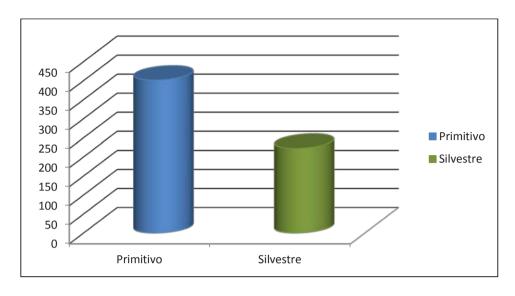


Figura 6. Total de existencia de entradas primitivas y silvestres en el BANOA

Tabla 1.

Número de entradas de poblaciones primitivas coleccionadas por provincia y departamento

PROVINCIA	DEPARTAMENTO	ENTRADAS
	Santa Victoria	278
	Iruya	69
	Los Toldos	4
SALTA	Molinos	2
	Cafayate	1
	San Martín	1
	TOTAL	355
	Yavi	1
	Huahuaca	2
шшу	Tumbaya	8
JUJUY	Valle Grande	4
	Tilcara	19
	TOTAL	34

PROVINCIA	DEPARTAMENTO	ENTRADAS
TUCUMÁN	Tafí del Valle	6
TUCUMAN	TOTAL	6
	Belén	3
CATANAADCA	Santa María	2
CATAMARCA	Tinogasta	1
	TOTAL	6
TOTAL ENTRADAS		401

Tabla 2. Número de entradas de poblaciones silvestres coleccionadas por provincia y departamento

PROVINCIA	DEPARTAMENTO	ENTRADAS
	Chicoana	31
	Santa Victoria	22
	Capital	33
	la Caldera	21
SALTA	Rosario de Lerma	32
	Orán	6
	Cerrillos	6
	Anta	12
	General Guemes	1
	TOTAL	164
	Tumbaya	3
	Dr Manuel Belgrano	15
JUJUY	Valle Grande	6
	El Carmen	1
	TOTAL	25

PROVINCIA	DEPARTAMENTO	ENTRADAS
	Trancas	9
	Chiclingasta	7
	Tafí del Valle	4
TUCUMÀN	Burruyaco	1
	Monteros	1
	Tafí Viejo	2
	TOTAL	23
CATAMARCA	Andalgalá	4
CATAMARCA	Ambato	3
	TOTAL	7
CORDOBA	Punilla	2
	TOTAL	2
TOTAL ENTRADAS		221

Tabla 3. Sitios identificados para conservación *in situ*

PROVINCIA	SITIO	Nº DE POBLACIONES
	Escoipe	11
	Higuerillas	7
SALTA	Parque Nacional El Rey	12
	Los Toldos	13
	TOTAL	42
JUJUY	Yala	8
	TOTAL	8
	Clavillo	12
TUCUMÁN	Hualinchay	5
	TOTAL	17
TOTAL POBLACIONES		67

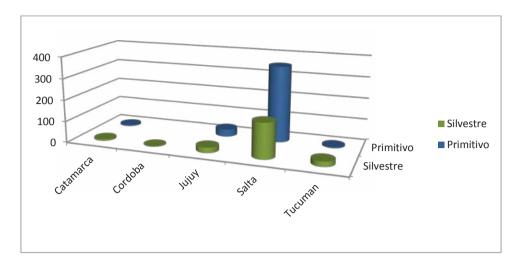


Figura 7. Porcentajes de entradas primitivas y silvestres por provincia.

Todo el germoplasma conservado en el BANOA está georreferenciado y se monitorea periódicamente la calidad y poder germinativo de las semillas.

De acuerdo a las tablas se pudo observar que tanto para las poblaciones primitivas como para las silvestres la mayor cantidad de entradas correspondió a la provincia de Salta, siguiéndole la provincia de Jujuy. En el caso de las primitivas la cantidad de entradas de las provincias de Tucumán y Catamarca son muy escasas y nula en Córdoba. Este número reducido de entradas se puede deber al avance de la agricultura que ha llevado en estas provincias a la desaparición o a la disminución de pequeños agricultores o a la falta de condiciones climáticas adecuadas, en alguna de ellas, para el cultivo (figuras 6 y 7).

Con respecto a las silvestres la cantidad de entradas coleccionadas en la provincia de Salta (164) superó ampliamente a las coleccionadas en las restantes provincias. Estas diferencias ponen de manifiesto que habría que incrementar las recolecciones en las provincias con bajo número de entradas.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados de las expediciones se concluye que si bien se ha reunido una importante cantidad de entradas de porotos primitivos y silvestres, esta colección podría ser incompleta. Por la consulta de herbarios, biblio-

grafía etnobotánica y etnohistórica, así como información recogida en la región aún quedaría por prospectar algunos valles aislados geográficamente y de difícil acceso donde aún se podría obtener nueva variabilidad tanto de la forma primitiva como silvestre que sería importante coleccionar antes de que se extingan definitivamente debido al cambio climático y el cambio en las costumbres de los pequeños agricultores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBA) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) el apoyo recibido a través de los diferentes proyectos de investigación otorgados a lo largo de las investigaciones realizadas y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España, proyecto i-COOP 2016SU0004).

BIBLIOGRAFÍA

- BERGLUND-BRUCHER O, BRUCHER H. 1976. The South american wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. Econ. Bot. 30: 257-272.
- BRUCHER H. 1988. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in south America. <u>En</u>: Gepts P (ed) Genetic resources of *Phaseolus* beans. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- BURKART A, BRUCHER H. 1953. *Phaseolus aborigineus* Burk. Diemutmasseliche andine Stammform del Kultubhone. Zuchter 23: 65-72.
- CANALS FRAU S. 1940. La distribución geográfica de los aborígenes del noroeste argentino en el siglo XVI. Anales del Instituto de Etnografía Americana. Universidad Nacional de Cuyo. Tomo I.
- DEBOUCK DG. 1986. *Phaseolus* germplasm collection in Northwestern Argentina. Trip Report. IBPGR 86.
- KAPLAN L. 1981. What is the origin of common bean? Econ. Bot. 35: 240-254.
- MÁRQUEZ MIRANDA F. 1945. El ambiente geográfico y la vivienda rural en Iruya y Santa Victoria. Gaea 7: 317-337

- MENÉNDEZ SEVILLANO MC, PALACIOS R, ZALLOCCHI EM, BRIZUELA MM. 1998. *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae): Estudio de poblaciones silvestres argentinas. Agrociencia 32(2): 131-137.
- MENÉNDEZ SEVILLANO MC. 2002. Estudio y conservación del germoplasma silvestre y primitivo de *Phaseolus vulgaris* L. en el Noroeste de Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- OTTONELLO MM, LORANDI AM. 1987. Introducción a la arqueología y etnología argentina: 1000 años de historia argentina. EUDEBA, Buenos Aires.
- PARODI LR. 1953. Relaciones de la agricultura prehispánica con la agricultura actual. An. Acad. Nac. Agron. Vet. B. As. 1: 115-167.
- PARODI LR. 1966. La agricultura aborigen en la Argentina. EUDEBA, Buenos Aires.
- TORO O, THONE J, DEBOUCK D. 1990. Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): description and distribution. International Board for Plant Genetic Resources (IBP-GR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

Actas AEL 7

VI SEMINARIO DE JUDIA

Colección de rhizobia de la MBG-CSIC y estudio de su eficiencia simbiótica con judía

A. Paula Rodiño, Manuel Riveiro, Antonio M. de Ron

Biología de Agrosistemas, Misión Biológica de Galicia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC). Pontevedra, España

Abstract

In the MBG-CSIC there is a collection of rhizobia strains collected from soils in Galicia (NW Spain). Within this collection 36 strains were isolated, and in addition there is also a collection of reference strains. Ten bean genotypes selected in previous works and 10 strains of rhizobia which include local isolates and reference strains, have been evaluated both in greenhouse and field and in conditions of standard irrigation and under water stress. In the *Rhizobium* inoculation test it was observed that the increase of dry nodular weight produced less seed yield. The PHA-0683 genotype presented a great uniformity on nodule size and a lineal correlation with yield when it displays the big nodule phenotype. The genotype-strain relationship is very specific and the EXIC, EXIB, EG, EF, EPOB, APAFI, LTMF y SLL2 strains achieved the greatest productivity with some genotypes in drought conditions what make possible their use as efficient inoculating strains.

Keywords

Biodiversity, drought, Phaseolus, Rhizobium, symbiosis.

Resumen

En la MBG-CSIC existe una colección de cepas de rhizobia colectadas en suelos de toda Galicia, habiéndose obtenido aislados de 36 cepas y, además, se dispone de una colección de cepas de referencia. Se han evaluado, tanto en invernadero como en el campo, 10 genotipos de judía seleccionados de trabajos previos y 10 cepas de rhizobia, incluyendo aislados locales y cepas de referencia en condiciones de riego y de estrés hídrico. En estos ensayos se observó que a medida que la masa nodular aumentaba, la producción de semilla disminuía. La variedad PHA-0683 muestra un fenotipo de nódulo grande y con una correlación lineal con la producción. La relación variedad-cepa es muy específica y las cepas locales EXIC, EXIB, EG, EF, EPOB, APAFI, LTMF y SLL2 lograron el máximo de productividad en condiciones de estrés hídrico, lo cual pone en valor su posible uso como inoculantes eficientes.

Palabras clave

Biodiversidad, Phaseolus, Rhizobium, sequía, simbiosis.

INTRODUCCIÓN

La importancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa radica en la capacidad del nuevo órgano formado, el nódulo, de transformar el nitrógeno atmosférico en N asimilable para la planta, con lo que de esta manera se incorpora a la cadena trófica. La fijación biológica del N_2 es un proceso de reducción que convierte el nitrógeno molecular en amonio, según la siguiente ecuación:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16 (ADP + Pi)$$

La fijación de N es un proceso con una alta demanda de energía, lo que provoca un alto consumo de glúcidos por parte de los nódulos. En algunos estadíos de crecimiento la fijación de N consume 30-50% de los fotosintetizados netos por la planta al día (Minchin 1997). Como término medio los nódulos represen-

tan el 23% de la respiración total de la raíz. La tasa máxima de fijación de N se obtiene a los 40-55 días después de la emergencia y oscila entre 0,55 y 11,93 mg N planta⁻¹ día⁻¹. La mejor combinación simbiótica coincide con mayor eficiencia relativa (Hungría et al. 2003). El rendimiento de la fijación de N en judía es de 0 a 150 kg ha⁻¹ (Graham and Vance 2003), y es bajo si se compara con leguminosas forrajeras (Vadez et al. 1999).

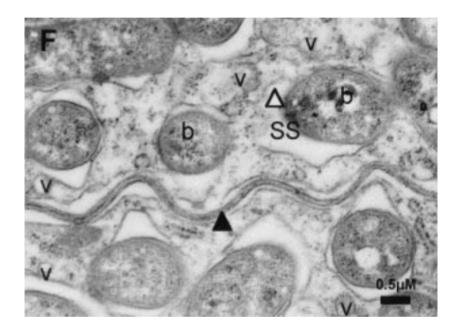


Figura 1. Sección de un nódulo de judía común. Triángulo negro, membrana plasmática planta; triángulo blanco, espacio vesícula endocítica o simbiosoma; b, bacterioide (*Rhizobium etli*); v, vesícula.

La familia *Rhizobiaceae* se define como células sin endosporas, normalmente con forma de bastón (figura 1). Son microorganismos aerobios, Gram negativos, que pueden utilizar distintos glúcidos como fuente de C. La capacidad del *Rhizobium* para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas y su gran implicación en la agricultura ha hecho que la taxonomía del grupo se

haya realizado, durante mucho tiempo, en función de las especies de leguminosas que pueden comportarse como huéspedes en la simbiosis. Todos los *Rhizobium* encontrados en judía fueron inicialmente asignados a la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* sobre la base de su especificidad de hospedador, y separados de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, simbiontes de vezas y tréboles (Kuykendall 2005). Actualmente todos ellos se hallan encuadrados dentro de dos géneros, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. La especie de *Rhizobium* que predominantemente nodula la judía común es *Rhizobium etli*, aunque también está descrita simbiosis con otras especies como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* bv. *phaseoli* y *R. tropici*. También puede nodular y fijar nitrógeno con otros géneros: *Sinorhizobium arboris* y *Mesorhizobium huakuii*. Este amplio rango de especies con las que puede nodular da ideas de su promiscuidad como huésped y de la existencia de gran diversidad de interacciones planta-rizobia (Graham 2008).

La seguía afecta de una forma intermitente o terminal a más del 60% de la superficie cultivada de judía en el mundo. Los efectos negativos del estrés hídrico dependen de la frecuencia, duración, intensidad y de la fase de crecimiento en que se produzca. La judía es muy sensible a la seguía durante la fase de prefloración y floración. El estrés hídrico en esta fase produce un exceso de floración, generación de vainas prematuras y aborto de semilla (Muñoz-Perea et al. 2006, Singh 2007). Las variedades sensibles frente al estrés responden con una fotoinhibición de forma más temprana, lo que afectará de forma directa su producción final (Lizana et al. 2006). En términos generales, el estrés hídrico supone una reducción de la biomasa, una reducción en la producción de grano (entre un 20 a 90%), un menor número de semillas y vainas, así como la reducción de la masa de las mismas. También se reduce la absorción de P, así como la concentración, distribución y fijación de nitrógeno (Serraj y Sinclair 1998, Muñoz-Perea et al. 2006). Incluso la nodulación se ve inhibida (Mnasri et al., 2007). Y también se produce un acortamiento de la raíz, lo que supone una disminución de la superficie de contacto con el suelo que se traduce en un menor transporte de nutrientes.

Durante el proceso de domesticación de la judía ha existido una divergencia de criterio entre la naturaleza y los mejoradores. Por un lado, la selección natural ha favorecido mecanismos para la adaptación y la supervivencia, mientras

que los mejoradores han intentado incrementar la productividad económica de los cultivares (Cattivelli et al. 2008). La selección de la judía común ha supuesto una menor adaptación de las especies domesticadas al estrés hídrico (Navea et al. 2002). A pesar de la identificación de varios criterios de selección para la resistencia a la sequía y el gran esfuerzo de los mejoradores durante la segunda mitad de siglo XX, la producción media de judía permanece muy baja (< 900 kg ha⁻¹). La baja heredabilidad estimada para el rendimiento de grano pone de manifiesto las dificultades existentes en el proceso de selección para incrementar la producción, cuando el único criterio de selección es el de producción de grano. Esto se complica al seleccionar bajo condiciones de estrés hídrico, ya que a menudo al seleccionar bajo estrés se produce una reducción de la producción en condiciones normales (Schneider et al. 1997).

COLECCIÓN DE RHIZOBIA DE LA MBG-CSIC

La Misión Biológica realizó en los años 2006-2007 una colección de cepas de rhizobia aisladas en diferentes suelos de Galicia, para así después aislar e identificar estas cepas por distintos métodos, por su crecimiento en distintos medios de cultivo, por su capacidad de nodulación y fijación de N. De todos los nódulos de raíces de judía colectados en diferentes zonas de Galicia se obtuvieron 36 aislados bacterianos. Estos aislados se han colectado en campos de ensayo identificándose con las iniciales de los ensayos y el número de parcela. Otras cepas se recolectaron en campos de agricultores identificándose con las iniciales de la zona de recolección y del agricultor. Además, también se dispone de 11 cepas de referencia, de diferentes especies de *Rhizobium* que establecen simbiosis con judía, enviadas del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México y del INRA de Montpellier (Francia).

El Centro de la Universidad Autónoma de México es donde se mantienen las cepas de *Rhizobium* de la zona de origen y donde se han caracterizado la mayor parte de las cepas de rhizobia usadas como controles para los estudios simbióticos. De todas estas cepas hay que mencionar que *R. giardinii* produce nódulos en judía pero no es eficaz, no fija N, con lo que se usó como testigo para la caracterización de los aislados españoles, pero no para los ensayos de invernadero y campo. Estos aislados fueron purificados en colonias únicas y se

conservan a -80° C en 50% de glicerol. Una vez que estos aislados están purificados, se hacen crecer en diferentes medios de cultivo para conocer mejor las características de estas cepas. Así se evalua su tolerancia a distintos parámetros como la salinidad, temperatura y pH que da una idea de la supervivencia de los diferentes aislados con diferentes limitaciones. También es importante evaluar la capacidad de fijación o efectividad y la capacidad de nodulación o infectividad, usando como control el cultivar internacional BAT477, ya que establece una simbiosis con judía eficaz y eficiente.

RESPUESTA AGRONÓMICA Y FISIOLÓGICA A LA INOCULACIÓN CON RHIZOBIA EN CON-DICIONES DE DÉFICIT HÍDRICO

Ensayo en invernadero

Este experimento consistió en un ensayo factorial en invernadero de 10 variedades de judía inoculadas con 10 cepas de *Rhizobium* en condiciones controladas de estrés hídrico y riego en invernadero (figura 2).



Figura 2. Ensayo en invernadero de EEA do Baixo Miño en Salceda de Caselas (2008).

El diseño experimental elegido fue el de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y dos tratamientos: regadío y estrés hídrico. En cada parcela elemental de 0,35 x 0,20 m se sembraron ocho semillas, dos semillas por golpe y se realizó un destrío en la fase de primer foliolo dejando cuatro plantas en cada parcela elemental. Se tomaron datos fenológicos (primera flor, inicio de floración, madurez de la vaina, primera vaina seca, índice reproductivo); datos de producción (granos por vaina, vainas por planta, materia seca aérea, biomasa, materia seca radicular, número de nódulos, materia seca nodular, porcentaje de nitrógeno, masa de 100 semillas, producción de grano, índice cosecha); índices de tolerancia a estrés hídrico (índice intensidad seguía, susceptibilidad seguía).

Dentro de cada variedad los valores de producción de materia seca aérea (MSA) varían de forma importante entre las distintas cepas utilizadas, hecho también observado en el trabajo de Rodiño et al. (2011) donde aparecían grandes diferencias en el desarrollo de la planta dependiendo de la cepa de Rhizobium inoculada. Esta gran especificidad en la unión cepa-variedad, hace necesario que en los planes de mejora genética, de forma paralela, haya que encontrar la cepa que optimice la producción de la variedad mejorada (Martinez-Romero 2003, Hungria et al. 2006, Rodiño et al. 2011). Los valores de materia seca radical (MSR) son similares a los de trabajos anteriores (Rodiño et al. 2011), con un rango de 0,26 g planta 1 a 4,24 g planta 1. En la tabla 1 se muestra el número de nódulos planta⁻¹ en regadío. En regadío las variedades con mayor nodulación son PMB-0285 y PMB-0286, con un número medio de nódulos planta-1 de 242 y 140 respectivamente. Al ser genotipos con una gran biomasa radicular, se podía interpretar que este mayor sistema radicular es la causa del mayor número de nódulos. En regadío, existen combinaciones variedad-cepa que presentan un número increíblemente alto de nódulos que a veces multiplican por seis los valores medios de la variedad. Por ejemplo, la combinación de EXIB con la variedad PMB-0285 tiene de promedio 1098 nódulos planta-1, y la media de todas las cepas con esta variedad es de 242 nódulos. La existencia de dos repeticiones con valores similares, descarta la hipótesis de una mutación de la planta que bloquease el mecanismo de autolimitación del crecimiento nodular (Boiron et al. 2007), por lo cual esta excesiva nodulación habrá que atribuirla a una interacción de esta cepa con la variedad PMB-0285.

Tabla 1.

Medias del número de nódulos (nuNod) por planta de las variedades y cepas, en la parcela de regadío. En cada tabla aparece la menor diferencia significativa (LSD) para las variedades y las cepas.

nuNod _{Ud}			Cepa			
Regadío	SLL2	CIAT 899	CFN 42	EXIC	EXIB	Ÿ
PHA-0155	17,75	13,00	21,75	25,00	12,25	16,65
PHA-0432	34,25	37,75	7,25	19,25	0,75	21,85
PHA-0471	23,75	56,00	34,75	28,50	17,50	90,00
PHA-0483	63,00	37,25	49,75	109,50	3,75	42,85
PHA-0683	42,25	64,75	25,25	47,50	25,00	34,98
PMB-0220	2,50	12,25	30,75	27,25	4,75	13,23
PMB-0222	5,75	21,25	409,25	5,00	38,50	62,03
PMB-0244	21,25	9,75	7,00	15,75	234,88	36,74
PMB-0285	97,75	69,00	369,75	67,25	1097,75	241,63
PMB-0286	22,00	132,00	173,25	206,50	38,50	139,98
Ÿ	33,03	45,30	112,88	55,15	147,36	69,99

nuNod _{Ud}			Сера			
Regadío	EG	EF	EPOB	APAFI	LTMF	Ÿ
PHA-0155	0,75	26,25	11,00	19,75	19,00	16,65
PHA-0432	27,75	15,25	26,50	29,25	20,50	21,85
PHA-0471	12,00	52,50	86,00	64,50	524,50	90,00
PHA-0483	37,50	79,75	7,25	35,25	5,50	42,85
PHA-0683	33,25	32,25	23,50	48,25	7,75	34,98
PMB-0220	7,00	13,75	27,25	2,50	4,25	13,23
PMB-0222	6,00	12,75	77,50	37,00	7,25	62,03
PMB-0244	9,50	25,25	16,25	17,50	10,25	36,74
PMB-0285	260,00	286,00	97,25	48,25	23,25	241,63
PMB-0286	373,75	27,25	67,75	89,25	269,50	139,98
Ϋ́	76,75	57,10	44,03	39,15	89,18	69,99
LSD var=133,7	3 LSD cep	a=140,26	α=0,05			

El estrés hídrico en este experimento supone una reducción media del 32,6% en MSA. Las variedades de mayor producción media de MSA por planta fueron PHA-0155, PHA-0471 y PMB-0220 en condiciones de estrés hídrico. *Rhizobium* es bas-

tante sensible tanto a la fertilidad del suelo como a los estreses ambientales que provocan una baja eficiencia en la fijación de N (Andrade y Hungria 2002). De hecho en el ensayo de seguía, las plantas inoculadas con la cepa R. tropici CIAT899 son las que mayor producción media de MSA alcanzan, por ser las que menor reducción de MSA sufren por el estrés hídrico. Posiblemente el incremento de producción en sequía de las variedades PHA-0471 y PMB-0220 sea debido a esta mejor adaptación a la seguía de la cepa de R. tropici CIAT899, que induce en estas variedades un incremento de la producción de la biomasa considerable. Las cepas LTMF, EXIC v SLL2 se pueden definir como cepas sensibles va que las plantas inoculadas con estas cepas presentan producciones en sequía significativamente peores al resto. En términos generales existe una importante reducción de la producción de MSR en las plantas sometidas a estrés hídrico. Aunque a primera vista resulte chocante una reducción del sistema radicular en condiciones de estrés hídrico, si se analiza en términos relativos esta variación, el porcentaje de MSR respecto a la MS total de la planta aumenta de 7,0% a 7,5%. Las plantas sometidas a estrés hídrico sufrieron una reducción media de MSR del 33,0%, valor similar al sufrido por la MSA.

En ambiente con estrés hídrico existe una disminución importante de la nodulación, así como de la reducción del rango de variación dentro de cada variedad de los valores de nódulos por planta de cada binomio variedad-cepa (tabla 2). Las plantas inoculadas con la cepa EPOB fueron las que tuvieron el mayor número de nódulos por planta en 4 variedades. En este ensayo el estrés hídrico supone una reducción media del 57,2% en el número de nódulos por planta. Las variedades que tienen mayor número medio de nódulos planta-1 en condiciones de estrés hídrico son PHA-0471 y PHA-0683, con 48 y 44 nódulos planta-1, respectivamente. Las plantas con mayor nodulación media son las inoculadas con la cepa LTMF con 49,98 nódulos planta-1. La cepa EPOB con PHA-0471 alcanza la nodulación máxima con 84,25 nódulos planta-1.

La variedad PHA-0683 presenta una gran uniformidad de calibre en sus nódulos. Cuando presenta nódulos grandes (BNO) (A), mantiene el calibre independientemente del número de nódulos que tenga la planta y lo mismo sucede cuando son nódulos pequeños (SNO) (B) (figura 3). Las combinaciones variedad-cepa generan cantidades y tamaños de nódulos diferentes según el ambiente tenga estrés hídrico o no. Como se puede observar en la figura 4, cuando PMB-0222 es inoculada con la cepa EPOB, los nódulos de plantas en regadío son de gran tamaño y con-

trastan con el tamaño diminuto de los generados en sequía (figura 4). En cambio, cuando PHA-0683 es inoculada con la cepa EG ocurre lo contrario. Por lo que se pone de manifiesto que tanto los mecanismos de infección de la cepa y como la morfología de las células de la raíz se ven afectadas por el estrés hídrico.

Tabla 2.

Medias del número de nódulos (nuNod) por planta de las variedades y cepas, en la parcela de sequía. En cada tabla aparece la menor diferencia significativa (LSD) para las variedades y las cepas.

nuNod Ud			Сера			
Sequía	SLL2	CIAT 899	CFN 42	EXIC	EXIB	Ϋ́
PHA-0155	52,25	18,50	11,25	11,25	20,50	27,65
PHA-0432	16,50	40,25	5,75	0,50	25,50	20,43
PHA-0471	53,50	31,50	30,25	37,75	45,00	47,50
PHA-0483	33,25	14,75	19,50	19,00	9,50	22,78
PHA-0683	47,50	32,00	50,25	33,50	41,00	43,60
PMB-0220	32,75	6,75	8,50	44,75	19,50	24,85
PMB-0222	37,00	50,75	27,50	11,00	23,25	26,15
PMB-0244	32,25	5,00	10,75	19,00	25,50	23,50
PMB-0285	65,25	3,50	43,00	27,50	21,50	30,95
PMB-0286	23,75	15,25	70,00	33,00	18,25	32,40
Ÿ	39,40	21,83	27,68	23,73	24,95	29,98

nuNod _{Ud}			Cepa			
Sequía	EG	EF	EPOB	APAFI	LTMF	Ÿ
PHA-0155	31,75	12,50	69,00	21,50	28,00	27,65
PHA-0432	24,50	13,25	48,25	12,25	17,50	20,43
PHA-0471	37,25	35,50	84,25	36,75	83,25	47,50
PHA-0483	45,50	10,25	24,50	13,75	37,75	22,78
PHA-0683	80,00	26,00	53,50	21,75	50,50	43,60
PMB-0220	17,25	14,25	27,75	11,75	65,25	24,85
PMB-0222	36,75	17,00	13,50	5,75	39,00	26,15
PMB-0244	26,75	6,00	52,50	7,75	49,50	23,50
PMB-0285	31,75	36,25	28,50	5,25	47,00	30,95
PMB-0286	40,25	17,75	18,00	5,75	82,00	32,40
Ϋ́	37,18	18,88	41,98	14,23	49,98	29,98
LSD var=11,87	LSD cepa	a=12,45	α=0,05			



Figura 3. Variación del tamaño del nódulo en función de la variedad y la cepa.



Figura 4. A y B: nódulos de la variedad PMB-0222 inoculada con la cepa EPOB, en regadío (A) y sequía (B). C y D: nódulos de la variedad PHA-0683 inoculada con la cepa EG, en regadío (C) y sequía (D).

Ensayo de campo

Este experimento consistió en un ensayo factorial de 10 variedades de judías inoculadas con 10 cepas de *Rhizobium* en condiciones controladas de estrés hídrico y regadío en campo (figura 5). El diseño experimental elegido fue el de bloques completos al azar con dos repeticiones y dos tratamientos. La parcela experimental medía 0,75 m², la distancia entre surcos fue 0,50 m y entre plantas 0,10 m. Las dos repeticiones inoculadas con la misma cepa se sembraron de forma contigua, para evitar problemas de contaminación con otras cepas. Entre las parcelas con diferentes cepas se sembraron tres surcos de maíz para evitar posibles contaminaciones. Se tomaron los mismos datos que en el ensayo del invernadero.

La producción media de MSA en regadío fue de 34,20 g planta ⁻¹. La producción de MSA de las plantas inoculadas con la cepa LTMF fueron significativamente superiores a las demás con 46,70 g planta ⁻¹. Las plantas del control cero alcanzaron las producciones más bajas de MSA y las del control con N obtuvieron valores intermedios. El número medio de nódulos en regadío fue de 29 nódulos planta ⁻¹. PMB-0286 presenta la mayor nodulación con 56,90 nódulos planta ⁻¹, pero debido a la gran variabilidad de este parámetro, PMB- 0285, PMB-0222 y PHA-0155, con aproximadamente 40 nódulos planta ⁻¹, tendrían una nodulación similar. Las plantas inoculadas con CFN42 obtuvieron la máxima nodulación con 51,42 nódulos planta ⁻¹, que serían significativamente similares a las inoculadas con CIAT899, LTMF y EXIC, con 35 nódulos por planta ⁻¹. El control cero permite evaluar las poblaciones nativas de la rhizosfera con capacidad de generar nódulos. El crecimiento de las poblaciones nativas son significativas cuando las poblaciones inoculadas son muy bajas, y en cambio apenas pueden ser detectadas cuando las poblaciones inoculadas son altas.

El primer parámetro que se analiza relacionado con la partición de N en la planta es el porcentaje de N en la materia seca aérea (PNMSA), cuyo valor medio en regadío fue el 3,15%. PHA-0483, PHA-0683 y PHA-0432 con un valor que ronda 3,40%, fueron las variedades con mayor PNMSA. Las plantas del control con N y las inoculadas con CIAT899 y CFN42 fueron significativamente superiores al resto con 3,36%. La estabilidad de PNMSA está en función de lo limitante que pueda ser el N para cada variedad, cuanto más estable es este porcentaje más limitante debe ser el N para la planta.



Figura 5. Campo de ensayo en EEA do Baixo Miño en Salceda de Caselas, Pontevedra (2009).

El estrés hídrico supone en términos generales una disminución del 46% de MSA, situándose la media de MSA en 18,67 g planta⁻¹. PHA-0471 a pesar de sufrir una reducción de 22,50 g planta⁻¹ se mantuvo, junto a la variedad PMB-0285, PHA-0155 Y PMB-0286 como las variedades con mayor producción de MSA. Las plantas inoculadas con LTMF y APAFI son las de mayor MSA media, 25 g planta⁻¹, mientras las plantas de los dos controles fueron significativamente inferiores a todas las plantas inoculadas. El estrés hídrico es una de las principales causas de fallo en la nodulación, afectando a cada uno de los estados de la simbiosis, además de limitar el crecimiento y la supervivencia en el suelo del Rhizobium (Hungria et al. 2006, Mnasri et al. 2007). En este ensayo, la nodulación no se vio afectada por el estrés hídrico, pues no se produjo hasta 35 días después de la siembra (DAS). Los nódulos de la nodulación primaria ya pueden ser contabilizados en los 14 DAS (Kipe-Nolt et al. 1993). El estrés hídrico supone para todas las variedades un aumento en el número de nódulos por planta, aunque este aumento solo puede considerarse significativo en tres variedades: PHA-0432, PHA-0683 v PMB-0285.

El estrés hídrico supone una reducción de más del 50% del NMSA y afecta por igual a casi todas las variedades, debido a la fuerte interacción C/N. La planta sujeta a estrés hídrico limita el flujo de C hacia los nódulos lo que provoca un declive en la fijación de N (Gálvez et al. 2005). A pesar de ser PHA-0471 y PHA-0285 las variedades con mayores pérdidas en sequía, siguen manteniendo el NMSA más alto. Los dos controles y las plantas inoculadas con CIAT899 fueron las que tuvieron un valor significativamente inferior, comprendidos entre 0,28 y 0,38 g planta⁻¹. En condiciones de estrés hídrico, existe una menor dispersión de los datos de NMSA y NMSS, y favorece la correlación lineal entre las dos variables. La mayor correlación entre NMSA y NMSS puede deberse a que la escasez de N producida por el estrés hídrico, obligue a la planta a un uso más eficiente del N (figura 6).

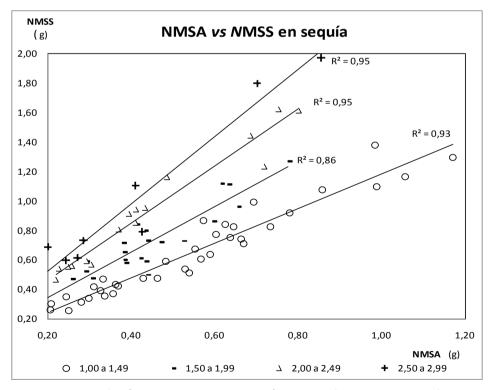


Figura 6. Relación NMSA vs NMSS en sequía para combinaciones agrupadas según su NHI.

No existe una cepa que produzca la mayor productividad con todas las variedades, lo que implica que existe una importante interacción genotipo*inóculo. El crecimiento de las cepas inoculadas están muy influenciadas por el pH (Wakelin et al. 2008) y los niveles de P en el suelo (Vadez y Devron 2001, Remans et al. 2007). Así pues, un inóculo elegido puede ser compatible con una variedad, y en determinadas condiciones de suelo puede tener problemas de adaptación y permitir que las poblaciones nativas *Rhizobium*, con menor capacidad de FBN, sean las que finalmente colonicen la planta (Romdhane et al. 2008). En suelos de baja fertilidad la FBN es la fuente principal de N de la planta. En el experimento de campo se observó una relación lineal entre NMSS y MSS, de forma que el N es un factor limitante para la producción de semilla. También se pudo comprobar cómo la FBN es sensible al estrés hídrico y cómo, en función de la cepa inoculada, la NMSS y MSS podían variar de una forma significativa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, proyecto i-COOP 2016SU0004), de la Xunta de Galicia (Contrato-Programa CSIC OTR00114 y cesión de infraestructuras) y de la Diputación de Pontevedra (cesión de infraestructuras).

BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADE DS, HUNGRIA M. 2002. Maximizing the contribution of biological nitrogen fixation in tropical legume crops. En: Finan TM, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey JK, Newton W (eds.) Nitrogen fixation, global perspectives: 341-345. CABI Publishing, Oxon.
- BOURION V, LAGUERRE G, DEPRET G, VOISIN AS, SALON C, DUC G. 2007. Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. Ann. Bot. 100: 589-598.
- CATTIVELLI, L, RIZZA F, BADECK FW, MAZZUCOTELLI E, MASTRNGELO AM, FRANCIA E, MARÈ C, TONDELLI A, STANCA AM. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crop Res. 105: 1-14.

- GÁLVEZ L, GONZÁLEZ EM, ARRESE-IGOR C. 2005. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. J. Exp. Bot. 56: 2551-2561.
- GRAHAM PH. 2008. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. En: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds.) Leguminous nitrogen-fixing symbiosis: 23-58. Springer, Dordrecht.
- GRAHAM PH, VANCE CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 131: 872-877.
- HUNGRIA M, CAMPO RJ, MENDES IC. 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. Biol. Fertil. Soils 39: 88-93.
- Hungría M. Franchini JC, Campo RJ, Crispino CC, Moraes JZ, Sibaldelli RNR, Mendes LC, Arihara J. 2006. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contribution of biological $\rm N_2$ fixation and N fertilizer to grain yield. Can. J. Plant Sci. 86: 927-939.
- Hungría M. Franchini JC, Campo RJ, Crispino CC, Moraes JZ, Sibaldelli RNR, Mendes LC, Arihara J. 2006. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contribution of biological $\rm N_2$ fixation and N fertilizer to grain yield. Can. J. Plant Sci. 86: 927-939.
- KIPE-NOLT JA, VARGAS H, GILLER KE. 1993. Nitrogen fixation in breeding line of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil 152: 103-106.
- KUYKENDALL LD. 2005. Family I Rhizobiaceae. En: Garrity G, Krieg NR, Holt JG (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2ª edición): 324-340. Springer, New York.
- LIZANA C, WENTWORTH M, MARTINEZ JP, VILLEGAS D, MENESES R, MURCHIE EH, PASTENES C, LERCARI P, VERNIERI P, HORTON P, PINTO M. 2006. Differencial adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress: I Effects of drought on yield and photosynthesis. J. Exp. Bot. 57: 685-697.
- MARTINEZ-ROMERO E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus* symbiosis: overview and perspectives. Plant Soil 252: 11-23.
- MINCHIN. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Soil Biol. Biochem. 29: 881-888.

- MNASRI B, AOUANI ME, MHAMDI R. 2007. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. Soil Biol. Biochem. 39: 1744-1750.
- Muñoz-Perea CG, Terán H, Allen RG, Wright JL, Westermann DT, Singh SP. 2006. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. Crop Sci. 46: 2111-2120.
- NAVEA C, TERRAZAS T, DELGADO-SALINAS A, RAMÍREZ-VALLEJO P. 2002. Foliar response of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* L. to water stress. Genet. Resour. Crop Evol. 49: 125-132.
- REMANS R, CROONENBORGHS A, TORRES GUTIERREZ R, MICHIELS J, VANDERLEYDEN J. 2007. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. Eur. J. Plant Pathol. 119: 341-351.
- RODIÑO AP, DE LA FUENTE M, DE RON AM, LEMA MJ, DREVON JJ, SANTALLA M. 2011. Variation for nodulation and plant yield of common bean genotypes and environmental effects on the genotype expression. Plant Soil 346: 349-361.
- ROMDHANE SB, AOUANI ME, TRABELSI M, LAJUDIE P DE, MHAMDI R. 2008. Selection of high nitrogen-fixing Rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) for Semi-Arid Tunisia. J. Agron. Crop Sci. 194: 413-420.
- Schneider KA, Rosales-Serna R, Ibarra-Pérez F, Cazares-Enriquez B, Acosta-Gallegos JA, Ramírez-Vallejo P, Wassimi N, Kelly JD. 1997. Improving common bean performance under drought stress. Crop Sci. 37: 43-50.
- SERRAJ R, SINCLAIR TR. 1998. N₂ fixation response to drought in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann. Bot. 82: 229-234.
- SINGH SP. 2007. Drought resistance in the race Durango dry bean landraces and cultivars. Agron. J. 99: 1219-1225.
- VADEZ V, DEVRON JJ. 2001. Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Agronomie 21: 691-699.
- VADEZ V, LASSO JH, BECK DP, DREVON JJ. 1999. Variability of N₂-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. Euphytica 106: 231-242.

WAKELIN SA, MACDONALD LM, ROGERS SL, GREGG AL, BOLGER TP, BALDOCK JA. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. Soil Biol. Biochem. 40: 803-813.

Actas AEL 7

VI SEMINARIO DE JUDIA

Aislamiento de endosimbiontes de nódulos de Phaseolus vulgaris (l.) var. Huasca, procedentes de la Amazonia Peruana y evaluación de su efectividad simbiótica

Jean Francis Saavedra-Cárdenas¹, Renzo Alfredo Valdez-Nuñez¹, Jose Carlos Rojas-García¹, Winston Franz Ríos-Ruiz¹, Antonio Castellano-Hinojosa², Eulogio J. Bedmar²

1 Laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín.

Tarapoto, Perú.

2 Departamento de Microbiología del suelo y Sistemas simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ-CSIC. Granada, España.

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most widely distributed and consumed grain legumes worldwide. Peru constitutes a large center for diversification of common beans, with 'fríjol Huasca' being the most widely accepted variety in the rural and urban Amazon markets. The common bean establishes symbiotic fixation of nitrogen (N_2) with rhizobia, a process that can supply part of the needs of N for plant growth and development. The objective of this research was to isolate, characterize and select endosymbionts with appropriate symbiotic effectiveness from five agricultural areas in the San Martín region of Peru. Twenty-two strains were isolated from nodules which showed a broad phenotypic diversity in terms of growth rate and ability to modify the pH. Out the 22 strains 4 of them, strains fo4s2, fsm5, ft4 and fsm15, were selected whose symbiotic efficiency with common bean in terms of plant dry weight was similar to that of the plants treated with 240 mg N per jar.

Keywords

Biological nitrogen fixation, food security, *Phaseolus, Rhizobium*, symbiosis, symbiotic effectiveness.

Resumen

El fríjol, poroto o judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una de las legumbres que más se cultivan y se consumen a nivel mundial. El Perú es un centro de diversificación de fríjol y la variedad "Huasca' es una de las de mayor aceptación en los mercados amazónicos rurales y urbanos. El fríjol establece simbiosis fijadoras de nitrógeno (N₂) con bacterias del suelo a las que se conoce con el nombre genérico de rizobios, lo que permite su cultivo en suelos de escasa fertilidad deficientes en nitrógeno combinado. Este trabajo tuvo como objetivos aislar, caracterizar y seleccionar cepas de rizobios con elevada efectividad simbiótica procedentes de cinco zonas de la región San Martín (Perú). A partir de los nódulos se aislaron 22 cepas que mostraron una amplia diversidad fenotípica en cuanto a la velocidad de crecimiento y capacidad para modificar el pH del medio. De las 22 cepas, se seleccionaron 4 de ellas, las cepas fo4s2, fsm5, ft4 y fsm15, cuya eficiencia simbiótica con fríjol común en términos de peso seco de la planta fue similar a la de las plantas fertilizadas con 240 mg de N.

Palabras clave

Efectividad simbiótica, fijación biológica de nitrógeno, fríjol, *Rhizo-bium*, seguridad alimentaria, simbiosis.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las legumbres, el fríjol, poroto, o judía común (*Phaseolus vulgar-is* L.) es nativa de Meso y Sudamérica y se introdujo en Europa a partir del siglo XV. Actualmente, se cultiva en el mundo entero y representa más del 50% de los productos derivados de leguminosas de grano para consumo humano directo (Day 2013). En el Perú se cultivan cerca de 30 variedades de fríjol y su siembra se ha incrementado un 20% en el periodo 2015-2017 (ENIS 2016). En la región

amazónica, se cultivan las variedades comerciales "Rosado Pequeño", "Caraota" y "Huasca", siendo esta última la de mayor preferencia en los mercados rurales y urbanos (MINAGRI 2016).

El fríjol establece simbiosis fijadora de nitrógeno (N_2) atmosférico con bacterias del suelo llamadas rizobios. El diálogo molecular que se establece entre los rizobios y las legumbres a las que infecta resulta en la aparición en las raíces, a veces en el tallo y en las hojas, de unos órganos especializados a los que se denomina nódulos donde se lleva a cabo el proceso de fijación, esto es, la reducción del N_2 a amonio (NH_4^+). El fríjol se considera una leguminosa de amplio rango de hospedador ya que forma nódulos con especies de los géneros *Rhizobium*, *Phyllobacterium* y *Bradyrhizobium* de las Alphaproteobacteria y *Cupriavidus* y *Burkholderia* de las Betaproteobacteria (ver revisiones de Peix et al. 2015; Shamseldin et al. 2017).

A pesar de formar nódulos con distintas especies de rizobios, se considera que el fríjol es de escasa capacidad fijadora de $\rm N_2$ cuando se compara con otras leguminosas, lo que se ha atribuido tanto a la ineficiencia de los rizobios nativos de un determinado suelo como al efecto negativo que distintos factores ambientales ejercen sobre la simbiosis. De hecho, se ha calculado que, en condiciones de campo, solo un 36% del N de la planta deriva de la fijación biológica (Herridge et al. 2008).

En la Amazonía peruana el rendimiento del fríjol alcanza 991 kg/ha (SIEA 2016) mediante el empleo de fertilizantes nitrogenados, lo que origina que la contaminación por nitratos sea cada vez más frecuente e intensa. La inoculación de leguminosas con los rizobios se considera una tecnología de bajo costo, respetuosa con el medio ambiente y que permite mejorar el rendimiento de los cultivos (Sánchez et al. 2014). En general, los suelos tropicales peruanos se caracterizan por su pH ácido y estar sujetos a altas temperaturas y condiciones de estrés hídrico (Hungría y Vargas 2000). Puesto que es necesario, por tanto, la selección de cepas de rizobios adaptados a tales condiciones, en consecuencia, el objetivo de la presente investigación fue seleccionar cepas nativas de rizobios con propiedades mejoradas desde el punto de vista de la fijación biológica de N₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de suelos y análisis de sus propiedades físico-químicas

Los suelos se colectaron de zonas agrícolas de Moyobamba, Bellavista, Lamas, San Martín y Tocache, zonas en las que es frecuente el cultivo de la variedad Huasca de fríjol en el departamento de San Martín. El análisis de las propiedades físico-químicas de los suelos se realizó siguiendo las recomendaciones del Soil Survey Staff (2009).

Experimentos de planta trampa. Esterilización de semillas. Condiciones de cultivo

Se utilizaron macetas de 1.0 l de capacidad que se rellenaron con los distintos suelos. Las semillas de fríjol se desinfectaron mediante tratamiento con etanol al 70% durante 1 min. seguido de inmersión en hipoclorito de sodio al 3.5% durante 5 min. Finalmente, se lavaron abundantemente con agua estéril, se germinaron en oscuridad a 30° C durante 48 h y se utilizaron para sembrar macetas (3 semillas/maceta) que se colocaron en un invernadero con luz natural y en un rango de 30° C/25° C de temperatura día/noche. Las plantas se regaron con agua de acuerdo a las necesidades del cultivo y se cultivaron en tales condiciones durante 30 días.

Aislamientos de endosimbiontes de nódulos de P. vulgaris

Después de su cultivo, las plantas se sacaron de las macetas y sus raíces se lavaron con agua estéril. Los nódulos de cada planta se mezclaron y 12 de ellos, elegidos al azar, se desinfectaron según el paso anterior y se lavaron abundantemente con agua estéril. Cada uno de los nódulos se depositó en una placa Petri, se le adicionó 2 gotas de agua estéril y se homogeneizó con una varilla de vidrio también estéril. El extracto resultante se utilizó para inocular placas Petri que contenían medio YEM (Yeast Extract Mannitol, Vincent 1970) suplementado con Rojo Congo (25 µg ml⁻¹). Los cultivos se incubaron a 30° C hasta la aparición de unidades formadoras de colonias (UFCs) a los 8-10 días de incubación. Las UFCs con diferente morfología se seleccionaron mediante inspección ocular con una

lupa de aumento 10X, y cada una de ellas se resembró en el mismo medio hasta la obtención de colonias morfológicamente uniformes.

Autenticación y caracterización de los endosimbiontes

Para comprobar aquellas capaces de infectar fríjol, las cepas seleccionadas se inocularon en tubos que contenían medio YEM líquido y se incubaron en agitación a 120 rpm durante 72 h a 30 °C. Una vez crecidos, los cultivos celulares se emplearon para inocular (1 ml, aproximadamente 108 células/ml) semillas germinadas de *P. vulgaris*, var. Huasca, previamente colocadas en bolsas de crecimiento que contenían la solución mineral estéril, libre de N, descrita por Broughton y Dilworth (1970). Las plantas se mantuvieron durante 21 días en una cámara de crecimiento funcionando en condiciones controladas de temperatura (26°/21° C día/noche) y fotoperiodo (14/10 h, luz/oscuridad). Las cepas capaces de formar nódulos se consideraron auténticos rizobios. Las características morfológicas y producción de metabolitos de los rizobios se evaluaron de acuerdo con Somasegaran y Hoben (1994).

Experimentos de eficiencia simbiótica

Para analizar la efectividad de la simbiosis entre el fríjol y las cepas seleccionadas, las semillas desinfectadas y germinadas se colocaron en jarras Leonard que contenían vermiculita estéril en la parte superior y la solución mineral descrita anteriormente en la parte inferior. Las semillas germinadas (2/jarra) se inocularon, de manera independiente, con 1 ml (108 células) de las diferentes cepas bacterianas. Las plantas se cultivaron durante 45 días en un invernadero con luz natural y en un rango de 30° C/25° C de temperatura día/noche. Se utilizó un diseño de bloques al azar empleando 3 jarras/tratamiento. Como control se utilizaron plantas cultivadas con la misma solución mineral suplementada con 240 ppm de N.

Evaluación de parámetros agronómicos

El peso seco de las plantas se estimó después de su secado a 65 °C hasta obtener peso constante. Para cada suelo, la eficacia (EFI) de la simbiosis se calculó

mediante la fórmula: EFI = PSPAi del tratamiento inoculado/PSPAc del tratamiento no inoculado sin nitrógeno) x 100 (Muniz et al. 2012), donde PSPAi es el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas y PSPAc es el peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas. Para los análisis estadísticos se empleó el análisis multivariable de Duncan (P < 0.05) del paquete informático InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los suelos empleados en este estudio son de textura franca, pH ácido a neutro (5.0-7.5) y de baja fertilidad. Se obtuvieron 22 cepas de rizobios a partir de 40 nódulos procedentes de plantas de frijol cultivadas en suelos de Moyobamba (6), Bellavista (6), Lamas (5), San Martín (6) y de Tocache (6), lo que demuestra la existencia en suelos de la Amazonía peruana de rizobios nativos adaptados a las condiciones medioambientales que prevalecen en tales suelos. Esto, por otra parte, permitiría la selección de cepas de rizobios para su empleo como inoculantes del fríjol (Mostasso et al. 2002).

Las cepas de rizobios mostraron gran diversidad en sus características de crecimiento. El 24,1% (7 cepas) fue de crecimiento rápido (< 3 días), el 72,4% (21 cepas) de crecimiento intermedio (3-5 días) y 1 cepa (3,4%) fue de crecimiento lento (6-7 días). El 58,6% de las cepas produjo metabolitos ácidos y el 41,4% metabolitos alcalinos en medio YEM. Otros autores, por el contrario, han mostrado que el 100% de las cepas de rizobios aislados de fríjol acidificaron el medio YEM (Pinto et al. 2007). La producción de polisacáridos, elevación y consistencia de las colonias originadas por las distintas cepas fueron muy variables.

La inoculación de fríjol con la cepa fsm19 dio lugar a los valores de peso seco (biomasa) más elevados (tabla 1), con una eficiencia calculada del 175% y una eficacia del 110%. Sin embargo, el contenido en N de las plantas inoculadas con las cepas fo4s2 y fsm5 fue mayor que el de las plantas inoculadas con la cepa fsm19. En contraste con nuestros resultados, la eficacia simbiótica alcanzada por cepas de rizobios empleadas en un programa de selección de rizobios de fríjol en suelos españoles fue solo de 56.9% (Mulas et al. 2011). Considerados en conjunto, las cepas que mostraron mayor desempeño simbiótico, debido a la acumulación de N en la parte aérea fueron fo4s2, fsm5, ft4 y fsm15 (figura 1). Actualmente, se llevan a cabo experimentos de inoculación de fríjol en condiciones de campo para evaluar su capacidad simbiótica en tales condiciones.

Tabla 1.

Peso seco y contenido en N de plantas de P. vulgaris variedad Huasca inoculadas con diversas cepas de rizobios. También se indica la procedencia de las cepas. Las plantas se cultivaron durante 45 días en presencia de una solución mineral libre de nitrógeno combinado. Los valores representan la media de tres réplicas y aquellos seguidos de una misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (5%).

Cepas	Procedencia	Peso seco (mg)	N (mg planta ⁻¹)	Eficiencia (%)	Eficacia (%)	Efectividad simbiótica
fo4s2	Lamas	2247 (±84) ^{ab}	27.39 (± 5.65) ^a	155	86	0.65
fsm5	San Martín	1687 (±203) ^{abcd}	26.67 (±6.74) ab	117	73	0.64
ft4	Tocache	2137 (±153) ^{ab}	23.74 (±2.78) abc	148	93	0.59
fsm15	San Martín	1933 (±252) abc	23.42 (±6.50) abc	134	84	0.58
fb1	Bellavista	1933 (±110) abc	23.21(±5.04) abc	134	84	0.58
fo4s1	Lamas	1920 (±329) abc	21.99 (±7.22) abcd	133	83	0.56
fsm19	San Martín	2537 (±327) a	21.83 (±6.94) abcd	175	110	0.55
fb4	Bellavista	1800 (±248) ^{abc}	21.08 (±5.44) abcd	124	78	0.54
fo3s1	Lamas	1503 (±452) bcd	19.20 (±.3.35) abcd	104	65	0.50
fo2s1	Lamas	1400 (± 116) bcd	17.63 (±0.58) abcd	26	61	0.46
fm3s2	Moyobamba	2030 (±560) abc	17.28 (±8.94) abcd	140	88	0.45
fb8	Bellavista	1577 (±87) bcd	16.65 (±2.68) abcd	109	69	0.43
ft16	Tocache	1473 (±23) bcd	16.46 (±0.84) abcd	102	64	0.43
fb8s2	Bellavista	1507 (±241) bcd	16.12 (±3.28) abcd	104	99	0.42
fsm17	San Martín	1847 (± 77) abc	15.78 (±3.19) abcd	124	78	0.41

Tabla 1. (continuación)

Peso seco y contenido en N de plantas de *P. vulgaris* variedad Huasca inoculadas con diversas cepas de rizobios. También se indica la procedencia de las cepas. Las plantas se cultivaron durante 45 días en presencia de una solución mineral libre de nitrógeno combinado. Los valores representan la media de tres réplicas y aquellos seguidos de una misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (5%).

Cepas	Procedencia	Peso seco (mg)	N (mg planta ⁻¹)	Eficiencia (%)	Eficacia (%)	Efectividad simbiótica
fm5	Moyobamba	847 (±222) ^d	14.29 (±7.33) ^{abcd}	59	37	0.37
fm1s2	Moyobamba	1650 (±372) abcd	13.26 (±5.01) abcd	114	72	0.34
ft11	Tocache	1593 (±202) bcd	12.25 (±2.48) abcd	110	69	0.30
ft18	Tocache	1390 (±156) bcd	11.40 (±0.63) abcd	96	09	0.27
fm3	Moyobamba	1190 (±278) ^{cd}	10.18 (±1.82) abcd	82	52	0.22
fb5	Bellavista	1700 (±208) abcd	9.37 (±2.91) bcd	118	74	0.18
ft17	Tocache	1733 (±124) abcd	9.04 (±3.00) ∞	120	75	0.17
Control 1 (Plantas tratadas con 240 mg N)		2300 (±159) ab	26.56 (±0.90) ª	159	100	0.64
Control 2 (Plantas no inoculadas y no						
tratadas con N)		1197 (±208) ^{cd}	6.13 (±0.22) ^d	83	52	0.00

CONCLUSIONES

Se han seleccionado cepas de rizobios eficientes en la simbiosis con fríjol común en la región de San Martín. El empleo como inoculantes de estas cepas podría resultar en rendimientos de cosecha de fríjol sin el empleo de fertilizantes nitrogenados sintéticos.



Figura 1. Plantas de *P. vulgaris* variedad Huasca. +N: plantas inoculadas y tratadas con 240 mg N. -N,-I: plantas no inoculadas y no tratadas con N. Ft4: Cepa de rizobio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto (Perú) por los fondos otorgados a través de la Oficina de Investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- BROUGHTON WJ, DILWORTH MJ. 1970. Plant nutrient solutions. <u>En</u>: Somasegaran P, Hoben HJ (eds), Handbook for rhizobia; methods in *legume-Rhizobium* technology: 245-249. Niftal Project, University of Hawaii, Hawaii.
- DAY L. 2013. Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. Trends Food Sci. Tech. 32: 25-42.
- Encuesta Nacional de Interacciones de Siembra (ENIS). 2016. Campaña agrícola Agosto 2016-Julio 2017. MINAGRI. http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=intenciones-de-siembra/intenciones-de-siembra-2016.
- HERRIDGE DF, PEOPLES MB, BODDEY RM. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil 311: 1-18.
- HUNGRIA M, VARGAS Mat. 2000. Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Res. 65: 151-164.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO (MINAGRI). 2016. Leguminosas de grano: Cultivares y clases comerciales del Perú. Lima-Perú.
- MOSTASSO L, MOSTASSO FL, DIAS BG, VARGAS MAT, HUNGRIA M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian cerrados. Field Crops Res. 73: 121-132.
- MULAS D, GARCÍA-FRAILE P, CARRO L, RAMIREZ-BAHENA MH, CASQUERO P, VELÁSQUEZ E, GONZÁLEZ-ANDRÉS F. 2011. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in northern Spanish soils: selection of native strains that replace conventional N fertilization. Soil Biol. Biochem. 43: 2283-2293.
- MUNIZ AW, COSTA MD, WOLFF CL, OLIVEIRA WAF, DE SÁ ES. 2012. Selecao de estirpes rizóbio para *Adesmia latifolia* (Spreng) Vogel. Biotemas 25:177-180.
- PEIX A, RAMIREZ-BAHENA MH, VELÁZQUEZ E, BEDMAR EJ. 2015. Bacterial associations with legumes. Crit. Rev. Plant Sci. 34: 17-42.
- PINTO FGS, HUNGRÍA MH, MERCANTE FM. 2007. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N2 with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem. 39: 1851-1864.
- SISTEMA INTEGRADO DE ESTADÍSTICA AGRARIA, SIEA. Julio 2016. Boletín Estadístico de Producción Agrícola, Pecuaria y Avícola. Ministerio de Agricultura y

- Riego. http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=publicaciones/boletin-estadisti-co-de-produccion-agricola-pecuaria-y-avicola-0
- SÁNCHEZ AC, GUTIÉRREZ RT, SANTANA RC, URRUTIA AR, FAUVART M, MICHIELS J, VANDERLEYDEN. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. Eur. J Soil Biol. 62: 105-112.
- SHAMSELDIN A, ABDELKHALEK A, SADOWSKY MJ. 2017. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. Symbiosis 71: 91–109. 10.1007/s13199-016-0462-3.
- SOIL SURVEY STAFF. 2009. Soil survey field and laboratory methods manual. Soil survey investigations Report No. 51, Version 1.0. Burt R (ed.). US Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- SOMASEGARAN P, HOBEN HJ. 1994. Handbook for rhizobia. Methods in legume-Rhizobium technology. Springer, New York.
- VINCENT M. 1970. Manual práctico de Rhizobiología. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.

Actas AEL 7

ANEXO 1

Actas AEL 7

Posición de la Asociación Española de Leguminosas sobre la reforma de la PAC

Maria Teresa MARCOS¹, Lucía De La ROSA¹, Teresa MILLÁN², Josefa RUBIO³, Ana María TORRES³, Luis ORTIZ⁴, Pedro CASQUERO⁵, Alfonso CLEMENTE⁶

1 Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos, INIA, Alcalá de Henares, Madrid
2 Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes, Universidad de Córdoba, Córdoba
3 IFAPA, Centro Alameda del Obispo, Córdoba
4 Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid
5 Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León, León
6 Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada

1. Introducción

Las leguminosas son cultivos estratégicos por su importancia en la historia, la agricultura, el medio ambiente y la alimentación. Acompañan a los seres humanos desde los inicios de la actividad agraria y su cultivo se ha mantenido por ser claves dentro de los sistemas agrarios, ya que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, son indispensables en las rotaciones de cultivo (sobre todo en las tierras de secano), mejoran la estructura del suelo y rompen los ciclos de enfermedades, plagas y malas hierbas de otros cultivos, lo que se traduce en un menor consumo de fertilizantes y productos fitosanitarios en la explotaciones agrarias que las emplean. Es indudable el papel fundamental que juegan en la agricultura ecológica y en el desarrollo rural sostenible, en la mejora de la biodiversidad y en la captura de CO₂. Muchas de estas cualidades positivas eran bien conocidas de forma empírica por los agricultores desde hace milenios.

La progresiva industrialización de la actividad agraria como consecuencia de la revolución verde provocó, a mediados del siglo XX, una fuerte erosión genética sobre este grupo de cultivos en muchas regiones del planeta. En algunos casos, por la desaparición de la especie en su conjunto de los campos de cultivo y, en otros, por la sustitución de las variedades locales, bien adaptadas a distintas condiciones agroclimáticas, por variedades comerciales más productivas pero con una base genética más estrecha, que sitúa a estas especies en una posición más vulnerable frente al cambio climático y al ataque de plagas y enfermedades. Se perdió diversidad, pero también se perdieron en muchos casos los conocimientos asociados al cultivo y manejo de las leguminosas dentro de los sistemas agrarios. En muchos países en desarrollo, no obstante, continúan siendo una fuente barata y casi única de proteína para la alimentación humana (por ello, se las denomina "la carne del pobre"). A pesar de la humildad de este grupo de cultivos, y de que su consumo disminuye con el incremento de la renta, son cada vez más numerosos los estudios científicos que confirman el efecto beneficioso de la ingesta habitual de legumbres sobre la salud de las personas, al prevenir la aparición de numerosas enfermedades crónicas: diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc. En cuanto al empleo en alimentación animal, tienen un gran potencial de utilización como alternativa a la soja, pues la dependencia de las importaciones de este producto en el ámbito europeo constituye una gran debilidad del sector agro-ganadero.

Para subrayar la importancia de las leguminosas de grano tanto desde el punto de vista ambiental como del de su uso en alimentación, la FAO declaró 2016 el **Año Internacional de las Legumbres**, y esta declaración ha impulsado la puesta en marcha de campañas de difusión que han permitido acercar a la población general la información generada en los últimos años acerca de estas especies que tienen un gran interés desde el punto de vista socioeconómico. No es una mera coincidencia que la FAO declarase a 2015 el Año Internacional del Suelo, ya que el cultivo de las leguminosas es un aliado indiscutible para la gestión de este recurso de forma sostenible.

Estas consideraciones iniciales, realizadas al nivel global, son perfectamente aplicables si el ámbito en el que nos centramos es el europeo o el nacional. Hay que recordar que a mediados del siglo pasado se cultivaban en nuestro país más de un millón de hectáreas (más del doble de la superficie actual), con una gran diversidad de especies y variedades que servían para cubrir buena parte de las necesidades proteicas de nuestra cabaña ganadera, así como para abastecer

a un mercado interior con un consumo de legumbres per cápita que triplicaba los escasos 3 kg por persona y año que se ingieren en la actualidad.

2. EL CULTIVO DE LAS LEGUMINOSAS Y LA PAC

Como toda actividad económica en el ámbito agrícola, la rentabilidad del cultivo de leguminosas viene determinada por las condiciones ambientales de cada zona, la especie y variedad seleccionadas, así como el manejo y los precios alcanzados en los mercados por la producción obtenida. Tampoco puede olvidarse que otro condicionante de la renta es la aplicación de políticas de ayudas en el sector. Así, la incidencia de la aplicación de la Política Agraria Común (PAC), con sus Organizaciones Comunes de Mercados, estrategias de gestión de los mismos y líneas de ayuda específicas para estas producciones, ha determinado en buena medida no solo la rentabilidad de estos cultivos, sino que la superficie cultivada haya experimentado oscilaciones más o menos intensas en función de la cuantía de las ayudas aplicadas, tanto en el conjunto de la Unión Europea como en España.

Dentro de las medidas de apoyo de la PAC a distintas leguminosas cabe destacar la recogida en el Reglamento (CEE) 1119/78 del Consejo, dirigida a los agricultores que cultivaban en el Mercado Común Europeo guisantes y haboncillos para alimentación animal. Su objetivo era compensarles por la eventual pérdida de renta originada por la fuerte competencia de la soja en los mercados internacionales después de haber experimentado durante los años 70 un boom de precios en los mismos. También perseguía reducir las importaciones de soja, de la que el sector ganadero tenía una fuerte dependencia. Reglamentos posteriores aprobados en los años 80 incorporaron a esta línea de ayudas la producción de altramuces dulces y habas, y otros destinos (alimentación humana) para guisantes y habas. En su conjunto, a estas especies se ha convenido en denominarlas proteaginosas. España pudo beneficiarse de las ayudas a su producción tras incorporarse al Mercado Común Europeo en 1986, gracias a un Reglamento aprobado en 1987. Esta circunstancia no supuso un incremento apreciable de la superficie cultivada de guisante hasta mediados de los años 90 y su efecto fue bastante limitado en el caso de las habas.

En 1989 se aprobó el Reglamento (CEE) nº 762/89 del Consejo por el que se implantaba una medida específica en favor de determinadas leguminosas de grano tradicionales en la agricultura del sur de Europa, como lentejas, garbanzos y vicias, teniendo en cuenta que el mantenimiento de su cultivo favorecía el interés económico y evitaba el desequilibrio de los mercados comunitarios. Esta medida de apoyo específica se traducía en la concesión de una ayuda por hectárea, y estaba previsto inicialmente que tuviera una duración de 3 años, pero tuvo sucesivas prórrogas. Dada la tímida respuesta del sector en los primeros años de implantación de esta medida, el nivel de ayudas se incrementó hasta duplicar, en la campaña 1995/96, el importe correspondiente a 1989. A ello hay que añadir la ventaja que suponía, en aquel momento, el tipo de cambio del ECU respecto de la peseta. En esa campaña la ayuda alcanzó los 181 ECUS/ha. La respuesta fue inmediata, y se llegaron a cultivar más de 300.000 has de veza (el doble del año anterior) dentro de un conjunto de más de 700.000 has del total de leguminosas grano, alcanzando el máximo histórico de las últimas décadas en ambos casos. El repentino incremento de superficie llevó aparejada una gran demanda de semilla de veza para siembra que no pudo suplirse con la producción nacional, y hubo que recurrir a importaciones masivas de semillas que en algunos casos no reunían las características adecuadas para su cultivo, lo que desincentivó a muchos agricultores, cayendo en picado la superficie cultivada. Esta tendencia se acentuó a partir del año 2006, momento en el que comenzó a aplicarse en España el régimen del pago único y sólo se revirtió, aunque de forma muy parcial, a partir de la campaña de 2009.

De entre los cultivos a los que aludía el Reglamento (CEE) nº 762/89, tanto yeros como garbanzos, siguieron una línea de tendencia semejante a la de la veza, en tanto que las lentejas experimentan un descenso en su superficie cultivada, pausado pero constante, desde la integración de España en el Mercado Común. En el año 2003 se puso en marcha la que probablemente sea la reforma más profunda de la PAC (en España comenzó a aplicarse en 2006), con la implantación de un régimen de pago único por explotación, desacoplado de la producción pero vinculado al cumplimiento de ciertos requisitos entre los que destacan aquellos relacionados con la conservación del medio ambiente y las buenas prácticas agrarias. La incertidumbre y desconocimiento del nuevo tipo de ayudas provocó una brutal caída de superficie cultivada de leguminosas,

hasta las 200.000 has en 2008 y se convirtió en el grupo de cultivos más perjudicados por la reforma. Otra de sus características era la de permitir un amplio margen de maniobra para su aplicación por parte de los Estados miembros, que debía ser evaluado con posterioridad. Esta revisión, comenzada en 2007 se denominó "Chequeo Médico". La filosofía sobre la que se asentaba era la de avanzar en el desacoplamiento de las ayudas respecto de la producción con algunas excepciones, como era el caso de las proteaginosas, a las que se les permitía disponer de un periodo de transición hasta 2012 para pasar a integrarse en el sistema general.

El descenso de superficie cultivada en el conjunto de las leguminosas fue tan intenso a finales de la pasada década, que tuvieron que ponerse en marcha dos Programas Nacionales cuyo objetivo era el de revertir esta situación: Programa Nacional para el Fomento de Rotaciones de Cultivo en Tierras de Secano y Programa Nacional para la Calidad de las Legumbres. Cumplieron en parte su objetivo, pues se pasó de las 311.000 has cultivadas en 2009 a las casi 450.000 has en 2010 y en más de medio millón en 2011. Estas cifras, aun siendo superiores a las de 2008, continúan muy alejadas de la superficie que idealmente debería sustentar este grupo de cultivos para cubrir las necesidades ambientales y de suministro de materias primas para el mercado interior.

3. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

La última reforma de la PAC se produjo en 2014, pasando en este caso del régimen del pago único al de pago básico con ciertos complementos, entre los que destaca el pago verde o "greening". En él las leguminosas pueden acceder a ayudas por contribuir a una mayor diversificación de cultivos y por ser consideradas, junto con los barbechos y las superficies agrícolas forestadas, superficies de interés ecológico. El desacoplamiento de las ayudas tiene algunas excepciones, fundamentalmente en el ámbito de la ganadería, pero también afecta a las leguminosas, permitiéndose mantener líneas de ayuda similares a las existentes en campañas anteriores, como la asociada a los cultivos proteicos (se incluyen leguminosas grano como: guisantes, habas, altramuz dulce, veza, yeros, algarrobas, titarros, almortas, alholva, alverja, y alverjón) o la ayuda asociada a las legumbres de calidad. En el primer caso es obligatorio el empleo de variedades

inscritas en el Catálogo común de variedades de la UE aunque se da la paradoja de que en varias de las especies de leguminosas afectadas (algarrobas, titarros y almortas) no hay ninguna variedad disponible en dicho Catálogo; en el caso de la alholva, si bien hay variedades inscritas, éstas se encuentran en los Registros de otros países, y no parece razonable emplear semilla de importación obtenida para otras regiones con características agroclimáticas muy diferentes a las nuestras.

De cara a los próximos años sería deseable que se ampliase la superficie cultivada de leguminosas de manera significativa, para lo cual convendría incrementar la cuantía de las ayudas y simultáneamente solventar los problemas que reducen su rentabilidad. La celebración el 15 de marzo del pasado año del Foro INIA: "Leguminosas. Producción y consumo. Una revolución pendiente" favoreció el encuentro de distintos agentes que operan en el sector, se identificaron las ventajas y las limitaciones de este grupo de especies, y se realizaron propuestas de mejora en distintos ámbitos. El análisis de las debilidades y fortalezas del sector coincide en buena medida con las recogidas para las proteaginosas en el informe final del Grupo Focal de cultivos proteicos de la Asociación Europea de Innovación en materia de Agricultura, EIP-AGRI, a pesar de referirse a distintos ámbitos geográficos.

Muchas de las reflexiones recogidas se han venido repitiendo como un mantra en las últimas décadas sin que el sector acabe de adquirir el peso que debería tener en nuestra agricultura y en la economía rural. La concesión de subvenciones para apoyar el cultivo es condición necesaria, pero no suficiente, para conseguir el buen funcionamiento del sector a largo plazo, como ya se demostró a mediados de los años 90 con ciertas especies de leguminosas grano. El incremento de superficie cultivada debería realizarse empleando semillas mejoradas, resistentes a plagas y enfermedades, adaptadas a las distintas condiciones agroclimáticas de nuestro país y que proporcionasen buenos rendimientos a los agricultores. Por otra parte, parece muy arriesgado supeditar la rentabilidad de unos cultivos a la concesión de subvenciones europeas, considerando la gran incertidumbre que existe en estos momentos acerca de la organización que tendrá la propia Unión Europea en los próximos años.

Por ello, desde la Asociación Española de Leguminosas (AEL; www.leguminosas.es) solicitamos que, paralelamente al estudio de la reforma de la PAC, se

pongan en marcha grupos de trabajo específicos que aborden el análisis de cada uno de los cuellos de botella del sector y se propongan soluciones factibles a los mismos. Especial atención debería prestarse a la formación de los agricultores, subrayando el valor de las leguminosas como elementos fundamentales para el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles por mejorar la estructura del suelo y su fertilidad, romper ciclos de plagas, enfermedades y malas hierbas de los cultivos con los que habitualmente se alternan y reducir, en consecuencia, la necesidad de utilizar productos fitosanitarios y abonos químicos.

También sería importante incidir en los aspectos positivos de la ingesta habitual de legumbres, que ha disminuido de forma drástica en las últimas décadas, realizando campañas permanentes de promoción de su consumo en el conjunto de la población y divulgando los resultados de los estudios, cada vez más numerosos, que muestran sus efectos beneficiosos sobre la salud al prevenir la aparición de numerosas enfermedades crónicas. Sería recomendable que tuvieran un papel muy destacado en los menús escolares, y que se puntuasen favorablemente los servicios de catering de las administraciones públicas que las incluyeran en una alta proporción. No obstante, esta iniciativa estaría incompleta si estas campañas no se centrasen en el consumo de legumbres de origen nacional y de calidad, apoyando las actuaciones de las Denominaciones de Origen Protegidas e Indicaciones Geográficas Protegidas. El hecho de que dos tercios de las legumbres que se consumen en nuestro país sean importadas indica que existe un amplio margen para que se incremente en nuestro territorio la superficie cultivada con estas especies y garantizar así la seguridad alimentaria.

En cuanto al peso que tienen en la actualidad las leguminosas de grano en la alimentación del ganado, dista mucho de ser el que tuvo hasta mediados del siglo XX, y la gran dependencia de las importaciones de soja que existe desde hace décadas en nuestro país coloca al sector ganadero en una tremenda situación de vulnerabilidad que podría derivar en una crisis de gran magnitud. Aunque se han desarrollado proyectos de sustitución de soja para la alimentación del ganado con resultados muy positivos, las alternativas a gran escala, con formulación de piensos en los que las leguminosas autóctonas podrían tener un peso mucho mayor, no se pueden improvisar. Sería recomendable favorecer el cultivo de estas especies que, en muchos casos, presentan un alto grado de rusticidad y escasas exigencias, y actuar simultáneamente sobre el sector productor

de piensos, facilitando las herramientas necesarias para que la elaboración de los mismos con materias primas autóctonas, alternativas a la soja, se convierta en una actividad sencilla y rentable.

En su conjunto, las medidas que se propongan como resultado de los trabajos de los distintos grupos deberían situar a las leguminosas, su cultivo y su consumo, en el puesto que se merecen.

Actas AEL 7

ANEXO 2

Actas AEL 7

La Asociación Española de Leguminosas (AEL) en el Año Internacional de las Legumbres

La AEL (www.leguminosas.es) fue fundada en el año 2000, y tiene como finalidad el apoyo y la promoción de las leguminosas en España mediante la coordinación de acciones de investigación en colaboración con el sector agrícola español, promoviendo foros de discusión entre los distintos interlocutores sociales, defendiendo la biodiversidad y fomentando nuevos usos de las legumbres. La AEL se postula como un catalizador en las relaciones entre la Administración, Consejos Reguladores, asociaciones, empresas y consumidores. En la actualidad, es miembro de la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) y de la Red Rural Nacional (www.redruralnacional.es). La AEL mantiene contactos permanentes con el sector productivo, siendo socios algunos de los Consejos Reguladores de las denominadas legumbres de calidad con Indicación Geográfica Protegida, asociaciones de agricultores y empresas del sector.

Siguiendo la resolución 6/2013 de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Asamblea General de las Naciones Unidas, en su 68º período de sesiones, proclamó el año 2016 **Año Internacional de las Legumbres** (AIL) (http://www.fao.org/pulses-2016/es/). La celebración de este año ha sido coordinada por la FAO en colaboración con gobiernos, organismos, organizaciones no gubernamentales y distintos actores sociales. En línea con estas actividades, la divulgación ha sido el eje principal de las actividades desarrolladas por la AEL con objeto de dar a conocer la importancia de su cultivo desde un punto de vista agronómico y medioambiental, así como su importancia en la nutrición y propiedades beneficiosas para la salud humana. De este modo, la AEL

ha interactuado con instituciones como el CSIC, el INIA, Universidades, colegios así como distintos colectivos en numerosos actos que han permitido dar visibilidad a dicha celebración. A continuación, se describen de manera detallada las principales actividades realizadas por la AEL y sus socios a lo largo del año 2016, que incluyen: (1) la organización y participación en jornadas centradas en las legumbres; (2) participación en la edición de volúmenes especiales y libros de divulgación dedicados a las legumbres; (3) colaboración con periódicos generalistas, páginas webs especializadas, programas radiofónicos de distinta naturaleza, blogs y mediante la utilización de las redes sociales. En definitiva, son muchas las actividades que hemos realizado con múltiples enfoques y formatos durante este Año Internacional de las Legumbres con la intención de dar a conocer los beneficios de las leguminosas en un mundo sostenible. Estas actividades y colaboraciones pretendemos tengan continuidad más allá de este Año Internacional, en el que deberemos intensificar nuestras colaboraciones con el sector productivo, la comunidad científica, la Administración y los consumidores.

1. Jornadas

XXVIII FORO INIA DE COLABORACIÓN PÚBLICO-PRIVADA. AÑO INTERNACIONAL DE LAS LEGUMBRES. "LEGUMINOSAS. PRODUCCIÓN Y CONSUMO. UNA REVOLUCIÓN PENDIENTE"

Organizado por el INIA, CSIC y la Asociación Española de Leguminosas se celebró el XXVIII Foro INIA de Colaboración Público-Privada. Año Internacional de las Legumbres. "LEGUMINOSAS. Producción y consumo. Una revolución pendiente". El acto tuvo lugar en el Salón de Actos del CSIC, calle Serrano 117, Madrid y congregó a más de 300 profesionales de la Administración, comunidad científica, agricultores y miembros de distintos colectivos de interés.



Las conclusiones de dicho foro se detallan a continuación:

La ONU ha declarado 2016 como el Año Internacional de las Legumbres (AIL), en este contexto, y dentro de la iniciativa Foros de Colaboración Público-Privada del INIA, en cooperación con la AEL (Asociación Española de Leguminosas) y el CSIC se ha considerado interesante hacer una revisión de la situación general de estos cultivos incluyendo aspectos agrícolas, medioambientales, nutricionales y de calidad, así como por su valor como elemento de la seguridad alimentaria.

Las leguminosas son cultivos multifuncionales claves para la agricultura, el medio ambiente, la alimentación y la cultura. Son capaces de fijar Nitrógeno atmosférico, son claves en las rotaciones, mejorantes de la estructura del suelo, capaces de romper ciclos de enfermedades y plagas, aplicables tanto en agricultura ecológica (abono verde) como en desarrollo rural sostenible, en la mejora de la biodiversidad y en la captura de CO₂, de gran interés para la alimentación animal, como piensos y como forraje, sin olvidar su importancia en gastronomía, siendo parte indispensable de la dieta mediterránea al ser portadores de proteínas de alta calidad.

En los últimos años se ha renovado el interés por el cultivo de leguminosas debido a factores como el aumento de la demanda de proteína vegetal, la dependencia económica de las importaciones de soja, el alto precio de abonos nitrogenados y el incremento de la superficie de cultivos ecológicos. Sin embargo, su cultivo en España tiende a disminuir y nuestro país es importador neto ya que la producción nacional alcanza únicamente el 31% de la demanda.

El Foro se organizó en tres bloques, que intentaron cubrir los aspectos relativos al material vegetal y mejora genética de leguminosas, las necesidades de investigación del sector productivo y la influencia de las leguminosas en nutrición humana y animal. Las conclusiones y líneas a tener en cuenta en cada uno de los bloques han sido las siguientes:

1. Material Vegetal y Mejora.

Para conseguir mejorar la productividad de las variedades actuales, a corto plazo, se ha planteado introducir variedades mejoradas con las siguientes estrategias fundamentales:

- Mejora de caracteres adaptativos (fecha de floración, dehiscencia de las vainas, porte).
- Mejora para la resistencia a enfermedades, en ocasiones devastadoras en estos cultivos.
- Mejora para la resistencia o tolerancia a estreses abióticos (frío, sequía).

El CRF-INIA como colección base de semillas de la Red Española y como colección activa nacional de leguminosas grano juega, junto a las demás colecciones de leguminosas grano de la Red del Programa de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos, un papel fundamental en estas estrategias al mantener las colecciones de leguminosas cultivadas y silvestres como fuentes de genes para la mejora. El mantenimiento de los estudios de la interacción *Rhizobium*-Leguminosa es imprescindible para conocer y mejorar el cultivo. En este momento se han contabilizado 19.400 especies de leguminosas y 80 especies de rizobios y existen diferencias de producción debido a la elección del inóculo, por lo que la selección de los mejores pares planta-bacteria es muy importante para aumentar el rendimiento de los cultivos.

Un elemento a tener en cuenta es la interacción planta-polinizador y facilitar esta interacción como un elemento positivo que mejora tanto la producción del cultivo como el mantenimiento de la biodiversidad.

Entre los estreses bióticos, el jopo es el principal factor limitante para la producción de leguminosas en países mediterráneos. Afortunadamente ya se han obtenido variedades resistentes que están en vías de registro europeo. Otras enfermedades a combatir mediante mejora son las royas y ascoquitosis. Durante la jornada, también se expusieron trabajos de mejora genética de variedades para eliminar o disminuir compuestos no nutritivos como los alcaloides en altramuz o los taninos y la vicina-convicina en haba. En el caso de la lenteja es necesario incrementar la variabilidad de la especie cultivada para lo que se plantea la utilización de especies silvestres del género *Lens*.

Las cualidades finales de las legumbres, sobre todo de las variedades ligadas a marcas de calidad como son las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) o las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP), deben fomentarse para apoyar su consumo y conseguir un mercado de calidad. En este apartado es especialmente interesante el estudio de la interacción del genotipo y el ambiente

ya que se observan diferencias tanto en producción como en el producto final procesado.

2. Sector Productivo

Los intereses expuestos por el sector productivo fueron muy variados, pero se apuntaron algunas ideas interesantes para la comercialización y estructuración de este sector como ligar la comercialización diferenciada a la biodiversidad. Un ejemplo de este caso son las legumbres ecológicas manchegas, que defienden su valor en la contribución a la conservación de aves esteparias, considerándose interesante el desarrollo de indicadores de impacto sobre biodiversidad y clima. En cuanto al sector envasador de legumbres, se manifiesta la necesidad de disponer de variedades homogéneas en color y tamaño, con evaluación organoléptica e integridad de la semilla.

Estamos en un buen momento para impulsar su producción y consumo (ayudas, importancia de la sostenibilidad, necesidad de atender demanda superior a la oferta, avances en I+D, interés de los consumidores...), pero para aprovechar esta circunstancia es imprescindible una acción coordinada y simultánea de todos los eslabones (desde la investigación a los agricultores, cooperativas, obtentores, administración, consumidores, divulgadores, etc...), que hasta ahora no se ha dado o se ha hecho sin la coordinación necesaria. El sector necesita contar con productos uniformes, en cantidades suficientes y de calidad. Para ello, se requiere disponer de semillas certificadas de variedades productivas y resistentes a enfermedades, adaptadas a nuestro clima y suelo y de campos en óptimas condiciones. Para la consecución de este objetivo es importante que el sector se implique directamente en los trabajos de I+D+i desde su origen. Es especialmente necesario impulsar la I+D en la búsqueda de tratamientos contra plagas y enfermedades, tanto para la producción tradicional como la producción ecológica, ya que éste es actualmente uno de los problemas más acuciantes para el sector productivo.

3. Nutrición humana y animal

Las leguminosas se consideran un alimento básico, ya que proporcionan un buen aporte de nutrientes, incluyendo el papel saludable de algunos compuestos bioactivos, que permiten considerar a las legumbres como alimentos

funcionales que ayudan a reducir la obesidad y la incidencia de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades cardiovasculares, inflamación y cáncer, aunque esta composición es variable entre géneros, especies y variedades y en función de las condiciones ambientales del cultivo. Una de las formas más atractivas para aumentar el consumo de leguminosas es conseguir productos con nuevas presentaciones y tratamientos (como por ejemplo, la extrusión o la fermentación e hidrólisis enzimática). En este sentido, se plantea como oportunidad el desarrollo de alimentos fortificados con leguminosas (snacks, cereales para desayuno, salchichas, etc.).

En alimentación animal las leguminosas se consideran fundamentalmente como concentrados proteicos, aunque su valor nutritivo y niveles de inclusión en raciones para animales es variable. Las llamadas substancias no-nutricionales (inhibidores de proteasas, fitatos, lectinas, etc.) y determinadas fracciones (oligo- y polisacáridos) ejercen *in vivo* un efecto biológico (no nutricional). En consecuencia, podrían ser de utilidad como alimentos funcionales por sus efectos sobre el crecimiento celular y la maduración intestinal, la ecología microbiana intestinal y la seguridad y bienestar animal (presencia de patógenos). En el caso de los rumiantes, las leguminosas pueden ser también fuentes de proteína de gran interés. Además, los compuestos bioactivos que contienen pueden contribuir a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero como el metano y de parásitos intestinales, aspectos que representan un valor añadido de indudable interés.









Subdirección General de Prospectiva y Coordinación de Programas



XXVIII Foro INIA de Colaboración Público-Privada

Año Internacional de las Legumbres "Leguminosas. Producción y consumo. Una revolución pendiente"

15 de marzo 2016. Salón de Actos del CSIC, Madrid



CICLO DE CONFERENCIAS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA SOBRE LAS LEGUMBRES EN LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Durante los meses de Febrero y Marzo 2016, la Universidad de Granada organizó en el Palacio de la Madraza un ciclo de conferencias de divulgación científica dedicado al Año Internacional de las Legumbres en el que participó nuestro Presidente de Honor, el profesor Jose Ignacio Cubero junto con destacados científicos y otros profesionales.



Invitada por el Instituto de Biotecnología y la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, el día 26 de abril de 2016 Lucía De la Rosa, en el marco

de la conmemoración del AIL, impartió la conferencia "Biodiversidad y conservación de las leguminosas españolas", unida a una exposición sobre la variabilidad de semillas.

EXPOSICIÓN DE LA COLECCIÓN DE SEMILLAS DE JUDÍA DEL SERIDA Y ACTIVIDADES DE LA COFRADÍA DE LES FABES.

El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) mostró, durante los días 9 y 10 de abril en la Casa de los Hevia (Villaviciosa), la exposición 'Colección de Semillas de Judía del SERIDA: diversidad genética conservada y variedades mejoradas', en el marco de las "XXIII Xornaes Gastronómiques de les Fabes", organizadas por el Ayuntamiento de Villaviciosa. La exposición tuvo por objeto mostrar la diversidad reunida en la 'Colección de Semillas de Judía' del SERIDA, recogiendo tres tipos de variedades de judía: (i) Variedades mejoradas de faba tipo "Faba Granja", donde se incluyen las obtenciones del SERIDA de este tipo varietal; (ii) variedades tradicionales de faba en Asturias, en el que se muestran una selección de variedades locales asturianas, para las que se ha solicitado su inscripción en el "Registro de variedades de especies hortícolas desarrolladas para su cultivo en condiciones determinadas" dentro del Registro de Variedades Comerciales; y (iii) algunas Judías españolas con marcas de calidad diferenciada, donde se incluyen judías de otras zonas de España que cuentan con DOP, IGP, o con alguna marca propia de calidad. Así mismo, en la exposición se mostró la variación en tipos de semillas obtenida a través de cruzamientos dirigidos utilizados para la obtención de nuevas variedades. Por otra parte, y coincidiendo con el Año Internacional de las Legumbres, La Cofradía de les Fabes organizó el 8 de abril una mesa redonda en torno a las propiedades y posibilidades de la "Faba Asturiana" y otras judías cultivadas en Asturias, en la alimentación y en la salud humana, en la que participaron reconocidos expertos y profesionales de diferentes ámbitos, y en la que actuó como moderador el Dr. Juan José Ferreira, responsable del Programa de Genética Vegetal del SERIDA.



CELEBRACIÓN DEL DÍA DE LA FASCINACIÓN POR LAS PLANTAS EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ, CSIC) EN GRANADA

Con motivo del Año Internacional de las Legumbres, se celebró el Día de la Fascinación por las Plantas en la Estación Experimental del Zaidín, contando con la participación de varios investigadores de este centro del CSIC expertos en leguminosas, y ofrecieron una perspectiva multidisciplinar incluyendo la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa así como el papel que juegan las legumbres en la alimentación humana y animal. La jornada también contó con la participación del Prof. Jose Ignacio Cubero (Univ. de Córdoba) que impartió la conferencia titulada "Biotecnología y mejora genética vegetal".



PARTICIPACIÓN DE LA AEL EN LA 9ª SEMANA VERDE DE LA UNIVERSIDAD DE SALA-MANCA

La Universidad de Salamanca ha llevado a cabo, durante los días 11-15 de abril, la celebración de la Semana Verde que este año alcanza su novena edición y que ha llevado como título "La legumbre es costumbre". De este modo, el elemento conductor y eje en torno al que ha girado los acontecimientos programados son los diferentes tipos de legumbres con Denominación de Origen, como la lenteja de la Armuña, el garbanzo del Pedrosillo o la judía del Barco de Ávila. La legumbre como elemento fundamental para la salud de las personas desde el punto de vista nutricional y también como elemento para el desarrollo de una agricultura sostenible. La Semana Verde contó con la colaboración de la escuela de hostelería de La Fonda Veracruz, ofreciendo una degustación de legumbres bajo el título "Las legumbres en la ciudad". Uno de los intervinientes, Manuel Rodríguez Cachón, investigador del Instituto Tecnológico Agrario de la Junta de Castilla y León (ITACyL) (http://www.itacyl.es) y socio de la AEL, impartió la conferencia "Mejora genética y agronómica de garbanzo y lenteja. Otras leguminosas grano", donde habló de las legumbres garbanzo y lenteja, así como de las bondades de las leguminosas grano (guisante proteaginoso, alverjón y yero) destinadas a alimentación animal.



LA AEL DIVULGA LA IMPORTANCIA DE LAS LEGUMBRES Y OTRAS LEGUMINOSAS EN COLEGIOS

Durante los días 25 a 27 de abril tuvo lugar en el Colegio Público Lorenzo Luzuriaga de Madrid la Semana Cultural, centrada en esta ocasión en las legumbres. Por este motivo y, respondiendo a la invitación realizada por el AMPA y el equipo directivo del colegio, Teresa Marcos, representando a nuestra Asociación, participó el día 26 de abril realizando una presentación con objeto de subrayar la importancia de las legumbres y otras leguminosas, y se completó con un taller en el que los niños y niñas (de 5ª y 6ª de primaria) pudieron observar plantas completas, semillas y flores de distintas especies.



Así mismo, y respondiendo a la solicitud del AMPA y de los profesores de Conocimiento del Medio, el día 25 de mayo se celebró un taller en el Colegío Público Juan de Austria, en Alcalá de Henares (Madrid), con el objetivo de dar a conocer las legumbres y leguminosas a los alumnos de los últimos cursos de educación primaria. La actividad fue organizada e impartida por Teresa Marcos y Lucía De la Rosa.

Estos son solo dos ejemplos de los muchos contactos que se han establecido con CEIP durante este año, además cabe mencionar que en varias ocasiones la AEL ha contactado con el CRF del INIA, solicitando su asesoramiento en la preparación de actividades que han incluido el intercambio de material vegetal y semillas para exposiciones como ha sido el caso de los colegios Los Tilos y Méjico de Madrid.



CELEBRACIÓN DE LA JORNADA "LAS LEGUMINOSAS: ¿UNA REVOLUCIÓN GASTRONÓ-MICA PENDIENTE? EN EL CAMPUS DE TORRIBERA CELEBRADA EN BARCELONA.

Con motivo del Año Internacional de los Legumbres, el Campus de la Alimentación de Torribera organizó el 24 de mayo una jornada titulada "Las leguminosas: ¿una revolución gastronómica pendiente? en la que reunió un total de 20 expertos en los campos de la nutrición, la gastronomía, la producción agroalimentaria y la comunicación tanto del mundo universitario, de la empresa y de la administración. El objetivo del encuentro, dirigida a estudiantes, profesionales y público en general, fue revisar y analizar el interés de las legumbres en una alimentación saludable desde diferentes perspectivas, divulgar conocimiento científico actual sobre el tema y degustar diferentes propuestas gastronómicas. La conferencia inaugural fue impartida por el Dr. Alfonso Clemente bajo el título "Las leguminosas en un mundo sostenible" dando una amplia introducción sobre las leguminosas desde las vertientes de la producción vegetal, la sostenibilidad, la nutrición y la salud que sirvió de aperitivo para las mesas temáticas que le sucedieron: (1) Comunicación, Nutrición y Salud; (2) Comunicación y la Gastronomía, y (3) Comunicación y la Calidad y Seguridad Alimentaria.



Mesa inaugural con el Director del Campus de la alimentación, Marius Rubiralta y el Presidente del AEL, Alfonso Clemente.

JORNADA PARA LA DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS GRUPOS FOCALES DE LA ASOCIACIÓN EUROPEA DE INNOVACIÓN EN MATERIA DE AGRICULTURA (AEI-AGRI) CELEBRADA EN MADRID.

El 31 de mayo, organizada por la Red Rural Nacional, tuvo lugar en el Centro Nacional de Capacitación Agraria de San Fernando de Henares (Madrid) la celebración de la Jornada para la difusión de los resultados de los Grupos Focales de la Asociación Europea de Innovación en materia de Agricultura (AEI-AGRI) europeos y nacional. A dicha jornada asistió Teresa Marcos en representación de la AEL. Las presentaciones de la jornada están accesibles a través de la página web de la Red Rural Nacional (RRN), en el detalle del Calendario de EVENTOS: http://www.redruralnacional.es/-/jornada-de-la-red-rural-nacionalpara-la-transferencia-de-los-resultados-a-nivel-nacional-de-los-grupos-focaleseuropeos-organizados-en-el-marco-de-la. Los informes finales de los Grupos Focales cuyas conclusiones se presentaron en la jornada se han publicado en la Sección INNOVACIÓN de la página web de la RRRN: http://www.redruralnacional.es/innovacion-aei. Esta sección también incluye un apartado denominado "Socios para la formación de GRUPOS OPERATIVOS": http://www.redruralnacional.es/buscador-de-socios. Esta herramienta tiene el objetivo de crear una red de asesores y servicios de apoyo a la innovación que sirva para la formación de grupos operativos.



LA AEL PARTICIPÓ EN EL II FORO DE GASTROEMPRENDEDORES ORGANIZADO POR LA CÁMARA DE COMERCIO DE CIUDAD REAL.

El II Foro GASTROEMPRENDE, organizado por la Cámara de Comercio de Ciudad Real, se celebró el pasado 16 de Junio, marcándose como objetivo ofrecer una visión general de la potencialidad del sector empresarial en materia agroalimentaria y turística y la manera en que los agentes implicados aportan innovación al sector con el objetivo de abrir nuevos caminos. Por ello, GASTROEMPRENDE aborda en su segunda edición la aplicación de la investigación al sector agroalimentario, las claves de la I+D en la gastronomía y el peso del sector hostelero como motor para el desarrollo del turismo. Alfonso Clemente ha participado en la mesa redonda titulada "I+D+Gastronomía. Impacto económico. La investigación y el desarrollo al servicio del sector. Valor añadido y repercusión en el negocio".



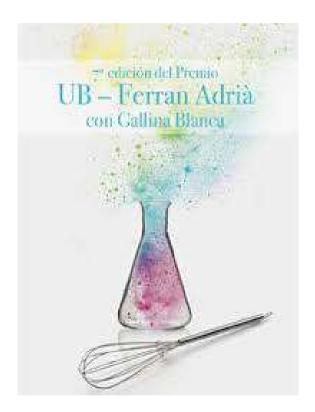
LA AEL PARTICIPA EN EL AULA DE CULTURA ALIMENTARIA "A ORILLAS DEL EBRO" EN ZARAGOZA

La Dra. Mercedes Martín, investigadora del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y alimentaria (Madrid) y miembro de la Asociación Española de Leguminosas (AEL), impartió la conferencia de clausura del Aula de cultura alimentaria "A orillas del Ebro", titulada "Legumbres: el retorno a la cuchara" el pasado 23 de Junio en Zaragoza. De revolución pendiente ha declarado la AEL la necesidad de que España y su población tome conciencia de la importancia de la producción y consumo de las legumbres, tanto en los planos medioambientales, como en los planos nutricionales y alimentarios, que han sido tradicionales en nuestra dieta mediterránea. La Dra. Martín abordó la necesidad del retorno a una cocina de cuchara y las propiedades gastronómicas de unas legumbres que han sido clásicas en la comida española, a través de las fusiones culturales de siglo.



LA AEL COPATROCINA EL PREMIO UB-FERRÁN ADRIÁ 2016 DEDICADO A LAS LEGUMBRES

La AEL, dentro del marco de colaboración firmado con la Fundación Triptolemos (www.triptolemos.org) para el desarrollo agroalimentario, copatrocinó el premio UB-Ferrán-Adriá 2016 dedicado a las legumbres. ub_ferran_adria_cas_ web



CICLO DE CONFERENCIAS QUÉ SABEMOS DE? CELEBRADO EN EL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA (IRNASA, CSIC) DE SALAMANCA

Con motivo del Año Internacional de las Legumbres, el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNASA, CSIC) de Salamanca organizó el 23 de septiembre una jornada de leguminosas dentro del ciclo de conferencias '¿Qué sabemos de...?' organizado por el CSIC. Estas conferencias pretenden construir un nuevo entorno de diálogo entre la comunidad científica y la sociedad, un espacio en el que los protagonistas de la ciencia explican la actualidad científica, sus procesos y su impacto en nuestra vida cotidiana, dejando también tiempo para el debate. Estas charlas surgen en el marco de las colecciones de libros ¿Qué sabemos de? y Divulgación, escritos por investigadores e investigadoras del CSIC. Un total de seis ponentes han abordado diferentes aspectos sobre los cultivos de leguminosas, los programas de mejora genética y sus problemas, así como del valor nutricional de las legumbres, su papel en la salud y en la Dieta Mediterránea. La jornada incluyó la intervención de Alfonso Clemente, científico de la EEZ-CSIC y Presidente de la Asociación Española de Leguminosas; Juana Frías, investigadora del ICTAN-CSIC; Manuel Rodríguez Cachón, del ITACyL; Diego Rubiales, investigador del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS, también del CSIC) y Presidente de la International Legume Society; Adela Martínez, del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA, Asturias) y Francisco González Pérez perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).





LA NOCHE EUROPEA DE LOS INVESTIGADORES EN EL AÑO INTERNACIONAL DE LAS LEGUMBRES

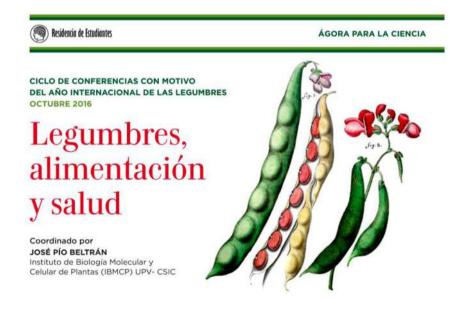
La Noche Europea de los Investigadores es un proyecto de divulgación científica promovido por la Comisión Europea dentro de las acciones Marie Sktodowska-Curie del programa Horizonte 2020, que tiene lugar simultáneamente en más de 300 ciudades europeas desde 2005. En Córdoba, hasta un total de 930 tapas elaboradas con legumbres se pusieron a la venta el 30 de septiembre en los restaurantes El Barón, El Otro, Bodegas Mezquita, Arbequina, Taberna de la Viuda, Puerta Sevilla y La Posada del Caballo Andaluz, dentro de la denominada **Ruta de las Legumbres**, producida por la Unidad de Cultura Científica y de la Innovación de la Universidad de Córdoba en colaboración con la Asociación Española de Leguminosas (AEL) y la Dra. Teresa Millán del Área de Genética Vegetal, enmarcada en el programa oficial de la Noche Europea de los Investigadores, evento promovido por la Comisión Europea y coordinado en Andalucía por la Fundación Descubre. Ese mismo día, Alfonso Clemente en un microencuentro en Granada habló sobre la importancia de las legumbres en nuestro medio am-

biente, nutrición v salud.



CICLO DE CONFERENCIAS "LEGUMBRES, ALIMENTACIÓN Y SALUD" ORGANIZADO POR EL CSIC EN LA RESIDENCIA DE ESTUDIANTES (MADRID)

Con motivo del Año Internacional de las Legumbres, el CSIC organizó un ciclo de conferencias en la Residencia de Estudiantes de Madrid titulado "Legumbres, alimentación y salud", coordinado por el profesor Jose Pío Beltrán del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en el que participaron el propio organizador, Jose Ignacio Cubero (Universidad de Córdoba) y Juana Frías (ICTAN-CSIC) como ponentes. En este ciclo de conferencias se habló de la fascinante historia de la selección e incorporación a nuestra dieta de las legumbres, de las perspectivas de las leguminosas para su mejora mediante las técnicas de ingeniería genética, así como del potencial de las legumbres para ayudar a controlar el síndrome metabólico, una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Esta actividad contó con financiación de FECYT a través de la Convocatoria de ayudas para el fomento de la cultura científica, tecnológica y de la innovación.



LA SEMANA DE LAS LEGUMBRES EN SEGOVIA ORGANIZADA POR LA ASOCIACIÓN ANDRÉS LAGUNA PARA LA PROMOCIÓN DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD

La Asociación Andrés Laguna para la Promoción de las Ciencias de la Salud organizó del 13 al 19 de octubre la Semana de las Legumbres en Segovia, patrocinada por la Diputación de Segovia y la Caja Rural de Segovia. Durante la Semana se destacó la calidad del judión de La Granja y el garbanzo de Valseca, reivindicándose el protagonismo de las legumbres en la Dieta Mediterránea. La semana se inició con una mesa redonda bajo el título "Aspectos nutritivos y gastronómicos de las legumbres"; asimismo, se llevó a cabo un taller demostrativo de cocina con legumbres, celebrándose una nueva mesa redonda, titulada "Producción y comercialización de legumbres" donde participaron como ponentes Nicolás Armenteros, Mercedes Martín Pedrosa y Emilio Gómez Izquierdo. Un concurso de recetas de legumbres y unos talleres de cocina infantil de con legumbres completaron el programa de esta Semana.



LA AEL PARTICIPA EN LA V FERIA LENTEJA TIERRA DE CAMPOS CELEBRADA EN MA-YORGA

En septiembre se celebró en Mayorga la V Feria de la Lenteja de Tierra de Campos, reconocida con una Indicación Geográfica Protegida y cuyas más de 1.100 toneladas de producción se concentran en municipios de las provincias de León, Palencia, Valladolid y Zamora. La V Feria de la Lenteja de Tierra de Campos tuvo como protagonista a la Ministra de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Isabel García Tejerina, quién fue galardonada con la Lenteja de Oro, así como con el cocinero Javier García Peña, que deleitó a los asistentes con sus espectaculares creaciones a base de Lenteja de Tierra de Campos en un showcooking. El evento congregó a un buen número de empresas adscritas a las marcas Productos de León, Alimentos de Palencia, Alimentos de Zamora y Alimentos de Valladolid para mostrar los beneficios de esta popular leguminosa coincidiendo con el AIL. También se disfrutó del tradicional y popular guiso de lentejas, una cata con vinos procedentes de las principales denominaciones de origen de Castilla y León y la conferencia "Lenteja: cultivo y aspectos nutricionales" en el Museo del Pan de Mayorga, en la que participaron nuestros compañeros Pedro Casquero y Juana Frías.



De izquierda a derecha: Jose Andrés García Moro (Presidente IGP Lenteja de Tierra de Campos), Javier Alonso Ponga (Director Técnico IGP Lenteja de Tierra de Campos), Isabel García Tejerina (Ministra de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) y Pedro Antonio Casquero (Miembro de Junta Directiva AEL).

LA AEL PATROCINA UN PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN PRESENTADA POR ES-TUDIANTES DE DOCTORADO EN EL CUARTO WORKSHOP INTERNACIONAL ASCO-CHYTA 2016

La AEL ha patrocinado el premio internacional "Bob Henson Award Ascochyta 2016" dentro del cuarto Workshop Internacional Ascochyta 2016, celebrado los días 10 y 11 de octubre en Troia (Portugal). El jurado concedió el galardón ex aequo a los estudiantes Esther Murube del SERIDA (Asturias, España) y Yasir Mehmood de la Universidad de Griffith (Queensland, Australia). Esther Murube mostró los resultados de la evaluación de una colección de Phaseolus vulgaris y Phaseolus coccineus frente a diferentes aislados de Phoma exigua var diversispora. Yasir Mehmood presentó un trabajo sobre el comportamiento de aislados de Phoma rabiei en líneas de garbanzo con diferentes niveles de resistencia. Los estudiantes Rama Harinath Reddy Dadu de la Universidad de Melbourne (Australia) Momiji Miki y Shiori Yamasaki de la Universidad de Okayama (Japón) recibieron su certificado de participación.



CELEBRACIÓN DEL VI SEMINARIO DE JUDÍA Y DEL SEMINARIO SOBRE EFICIENCIA DEL SISTEMA SIMBIÓTICO *PHASEOLUS-RHIZOBIUM* EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (GRANADA, CSIC)

En colaboración con la AEL y la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) y la Misión Biológica de Galicia (MBG), centros del CSIC, organizaron el VI Seminario de Judía en Granada. Los Seminarios de Judía se celebran desde 1997, en diferentes localidades, en ocasiones asociados a las Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas (AEL). En esta ocasión, el Seminario se celebró conjuntamente con la actividad del Proyecto del CSIC i-COOP 2016SU0004 "Seminario sobre la eficiencia del sistema simbiótico *Phaseolus-Rhizobium* y su incidencia en la genética y mejora", como punto de encuentro de investigadores y profesionales de leguminosas (judía), suelos y el sistema simbiótico leguminosas-rizobios.



CELEBRACIÓN DE LA JORNADA SOBRE CULTIVO DE LEGUMINOSAS EN LA FERIA AGROALIMENTARIA DE FERNÁN NÚÑEZ (CÓRDOBA)

En colaboración con la AEL, tuvo lugar en Fernán Núñez (Córdoba) la Jornada sobre el cultivo de leguminosas, dentro de la VI Feria Agroalimentaria que, bajo el título 'Sabores de nuestra tierra', acogió catas gastronómicas, la 'Fiesta del garbanzo' y jornadas técnicas, entre otras actividades. Teresa Millán y Josefa Rubio participaron en dicha jornada junto con otras investigadoras del IFAPA. Durante la celebración de la `Fiesta del garbanzo' tuvo lugar el concurso de cocina 'Fernán Núñez Gastronómico', en el que se mostraron platos elaborados con garbanzos lechosos de la tierra. Posteriormente, tuvo lugar una degustación de cocido y la entrega de premios de los concursos así como el nombramiento del 'Mejor cocinero de cocido de garbanzos de la Villa 2016'.



JORNADA SOBRE ALIMENTACIÓN Y SOSTENIBILIDAD, ORGANIZADA POR NUESTRO SO-CIO MENSA CÍVICA EN CÓRDOBA

Coincidiendo con la apertura de Biocórdoba 2016, en el Jardín Botánico de esta ciudad se celebró el 3 de noviembre la Jornada sobre Alimentación y Sostenibilidad, organizada por nuestro socio Mensa Cívica (www.mensacivica. com), en la que participaron como ponentes Alfonso Clemente, Presidente de la Asociacion Española de Leguminosas, y Jose Esquinas, con una extensa trayectoria en la FAO, versando sus ponencias sobre la importancia de las leguminosas en una agricultura y alimentación sostenible, proponiéndose una mayor relocalización productiva de las legumbres en España y una mayor diversidad en su producción, cultura culinaria y su consumo.

Mensa Cívica se constituye como una entidad sin ánimo de lucro creada con el fin de promover la coordinación entre todos los agentes económicos implicados en la comida colectiva, fomentando iniciativas que favorezcan las buenas prácticas a favor de una dieta equilibrada, apoyo a los alimentos locales, la sostenibilidad y a la biodiversidad, mediante la interrelación entre organizaciones sociales, productores y empresas que operan en la restauración colectiva. En 2016 se firmó un convenio de colaboración entre la AEL y Mensa Cívica para el desarrollo de una restauración colectiva sostenible.



CELEBRACIÓN DE LA JORNADA "SEMILLAS NUTRITIVAS PARA UN FUTURO SOSTENI-BLE" ORGANIZADA POR LA ESCUELA FAMILIAR AGRARIA EL SOTO DE CHAUCHI-NA (GRANADA)

El 8 de Noviembre tuvo lugar la jornada "Semillas nutritivas para un futuro sostenible" organizada por la Escuela Familiar Agraria El Soto de Chauchina (Granada) y orientada a alumnos de Formación Profesional del ciclo de Producciones Agroecológicas. La jornada consistió en una mesa redonda titulada "Las legumbres: un alimento saludable, un cultivo sostenible" en el que participaron los ponentes Manolo Cala, Jorge Alvarez de Toledo, Alfonso Clemente, Maria Luisa Lorenzo y Juan Francisco Romero; posteriormente, tuvo lugar la denominada Exposición de legumbres del mundo.



CELEBRACIÓN DE LA JORNADA "LA IMPORTANCIA DE LAS LEGUMBRES EN EL SECTOR AGROALIMENTARIO" ORGANIZADA POR LA ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS DE PALENCIA

En noviembre, la Universidad de Valladolid en su Campus de Palencia organizó la Jornada titulada "La importancia de las legumbres en el sector agroalimentario", cuyo objetivo fue analizar la importancia de las legumbres en el sector agroalimentario, abordándolo desde una perspectiva multidisciplinar en la que se incluye la producción y el cultivo de estas especies, el procesado y la transformación de las mismas, su aprovechamiento gastronómico o el empleo de las figuras de protección que se aplican a estos productos. En esta Jornada participaron varios socios de la AEL: Mercedes Martín Pedrosa (INIA), Álvaro Ramos, Manuel Rodríguez Cachón (ITACYL) y Javier Alonso Ponga (IGP Tierra de Campos).



XVI SEMANA DE LA CIENCIA EN MADRID

La facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid celebró los días 7, 11 y 18 de noviembre tres talleres sobre "Las legumbres, fuente de salud", dirigidos a alumnos de bachillerato y público en general. En estos talleres los asistentes, tras una explicación de su importancia en la dieta, observaron una importante colección de legumbres que se emplean en la alimentación humana y animal, conocieron su composición y valor nutritivo, así como las diferencias macro y microscópicas existentes entre ellas.



VII SEMANA DE LA CIENCIA, CELEBRADA EN PONTEVEDRA Y DEDICADA AL AÑO IN-TERNACIONAL DE LAS LEGUMBRES

En el Liceo Casino de Pontevedra tuvo lugar la celebración de la VII Semana de la Ciencia dedicada al Año Internacional de las Legumbres. Los organizadores y patrocinadores de la Semana fueron: Sociedad de Ciencias de Galicia, Liceo Casino de Pontevedra, Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), (Misión Biológica de Galicia MBG-CSIC), Estación Fitopatolóxica do Areeiro-Diputación de Pontevedra y la Unidad Asociada Sistemas Agroforestales (Estación Fitopatológica de Areeiro-Misión Biológica de Galicia). A lo largo de la Semana tuvieron lugar varios actos, entre los que destacan: (i) la celebración del Concurso Escolar de Dibujo "Las legumbres" y exposición de los más de 500 dibujos presentados, con el objetivo de concienciar a los estudiantes de su importancia para la sociedad; (ii) la celebración de la Mesa Redonda "Las legumbres: alimento de vida" con la participación de Alfonso Clemente, Miguel Pérez Dubois, Paula Rodiño, Jorge Sánchez y Antonio M. De Ron; (iii) el "Rincón de las legumbres" con una exhibición de legumbres que incluía paneles informativos, semillas, plantas, etc.; (iv) degustación de aperitivo de judía tipo "nuña" y de Fabada Galaica (Faba de la IGP "Faba de Lourenzá", Lugo); (v) Presentación del volumen 16 de la publicación Mol dedicada a las legumbres, editada por la Sociedad de Ciencias de Galicia; y (vi) Charla didáctica "Las legumbres" por Anxo Soto.









MESA REDONDA "LAS LEGUMINOSAS EN LA AGRICULTURA ESPAÑOLA" EN EL IAS DE CÓRDOBA

El pasado 14 de Diciembre se celebró en Córdoba una mesa redonda organizada por el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS, CSIC) e IFAPA con motivo del Año Internacional de las legumbres. El programa científico, coordinado por Diego Rubiales (IAS), contó con la presencia de Nicolás Armenteros (Director de Legumbres de Calidad), Alfonso Clemente (EEZ-CSIC, Presidente de la AEL), Jose Emilio Guerrero (Universidad de Córdoba), Salvador Nadal (IFAPA) y Antonio Sánchez (Agroquivir), cubriéndose aspectos relacionados con la agricultura, medio ambiente, alimentación humana y animal así como la importancia de las figuras de calidad de las legumbres, discutiéndose la problemática actual del sector y sus posibles soluciones.



JORNADAS "HUERTOS, LEGUMINOSAS Y ALIMENTACIÓN RESPONSABLE" ORGANIZA-DA POR LA ASOCIACIÓN CULTURAL CIUDADES COMESTIBLES (ALCORCÓN, MA-DRID)

La Asociación Cultural Ciudades Comestibles: Huertos Escolares, con motivo del Año Internacional de las Legumbres, celebró unas Jornadas en Alcorcón (Madrid) para poner en valor lo que significan las legumbres tanto para el huerto escolar como para la salud de toda la comunidad educativa en particular y los ciudadanos en general. Dichas Jornadas contaron con la participación de nuestra compañera Mercedes Martín impartiendo la ponencia "Las legumbres: la salud en tu despensa". Se impartieron otras ponencias relativas al papel que juegan las legumbres en la Dieta Mediterránea, la degustación de un cocido ecológico y otras actividades afines.

Ciudades Comestibles es una Asociación Cultural sin ánimo de lucro que tiene como finalidad la promoción de acciones a favor de la progresiva implantación de la agricultura urbana, estimular el conocimiento mutuo mediante la utilización de metodologías participativas en sus procesos de actuación y potenciar la utilización de tecnologías para el desarrollo humano.



LA AEL PARTICIPA EN LA CELEBRACIÓN DEL DÍA INTERNACIONAL DE DIETISTAS-NU-TRICIONISTAS DEDICADO A LAS LEGUMBRES EN VALENCIA

En 2016, la AEL firmó un convenio de colaboración con el Consejo General de Diestistas-Nutricionistas de España con objeto de realizar actividades de promoción de consumo de legumbres en España. Con motivo del Año Internacional de las Legumbres, el Consejo General de Dietistas-Nutricionistas de España (www.consejodietistasnutricionistas.com) en colaboración con la Asociación Española de Leguminosas, Mensa Cívica (www.mensacivica.com) y la Asociación 5 al día (www.5aldia.org) organizó la campaña #CucharasDeSalud, dedicando el Día Internacional de Dietistas-Nutricionistas a las legumbres. Las legumbres como beneficio para la salud, la prevención de las enfermedades prevalentes y su contribución a la sostenibilidad del medio ambiente, han sido los temas centrales de la Jornada Científica que se ha celebrado en Valencia, con motivo del Día Mundial del Dietista-Nutricionista, organizada por el Consejo General de Dietistas-Nutricionistas y la Academia Española de Nutrición y Dietética, con la participación de la Asociación Española de Leguminosas y Mensa Cívica. Durante la Jornada, la presidenta del Consejo General de Dietistas-Nutricionistas (CGDN), Alma Palau ha destacado la necesidad de volver a instaurar las legumbres como base de la Dieta Mediterránea.

También se puso de manifiesto que el consumo frecuente de legumbres puede asociarse a una disminución del riesgo de enfermedad isquémica del corazón; ayudar en el control de la hipertensión arterial, tanto en hipertensos como en normotensos; incidir en la disminución del colesterol LDL y asociarse con un menor riesgo de padecer cáncer colorectal. Además, los dietistas-nutricionistas han destacado que lejos de lo que se piensa, el consumo de legumbres se puede traducir en una mayor pérdida de peso cuando se incluye en dietas de adelgazamiento y ayudar en el mantenimiento del peso corporal.

Una de las actividades realizadas fue el lanzamiento del 1er Concurso de Recetas gastronómicas para Dietistas-Nutricionistas. Recientemente, ha tenido lugar el lanzamiento del recetario Legumbres para todos, con 49 recetas con legumbres elaboradas por Dietistas-Nutricionistas. Este documento recoge la riqueza de recetas sobre legumbres desde una perspectiva única, invitándonos a



De izquierda a derecha: Jorge Hernández (Presidente de Mensa Cívica), Alma Palau (Presidenta del Consejo General de Dietistas-Nutricionistas), Eduard Baladía (Fundación Española de Dietistas-Nutricionistas), Alfonso Clemente (Presidente de la AEL) y Joan Quiles (Jefe de Sección de Educación para la Salud de la Dirección General de Salud Pública de la Comunidad Valenciana).

explorar el uso de las legumbres en la cocina tradicional e innovadora, así como la destinada a los más pequeños de la casa. El recetario es de acceso libre en el siguiente link: http://diamundialdietistanutricionista.org/dmd-n-presentacion/dmdn-2016/recetario-2016/recetario-flipbook/



LA AEL COLABORA CON MENSA CÍVICA EN LA CAMPAÑA DESCUBRE LAS LEGUMBRES

Los comedores de cerca de 170 colegios de 11 provincias españolas, han sido protagonistas en la semana del 28 de Noviembre al 2 de Diciembre, de la campaña "Descubre las legumbres". Más de 27.000 niños han comido al menos una o dos veces legumbres de España como muestra de adhesión a una política de apoyo a una comida saludable y sostenible, con honda raigambre en la tradición alimentaria de los países mediterráneos. La campaña ha sido impulsada por la Asociación Mensa Cívica que reúne a más de 50 entidades económicas, sociales y profesionales ligadas a la comida sostenible. En algunos de los colegios que han realizado la campaña, que coincide con el Año Internacional de las Legumbres 2016 de la FAO, se han realizado actividades didácticas para los escolares, acompañadas de una Ficha didáctica, un folleto explicativo de la campaña y unas láminas para escolares que se puede descargar libremente en internet.

En el año 2016, Mensa Cívica junto a la Asociación Española de Leguminosas y el Consejo General de Dietistas y Nutricionistas han realizado diversos actos donde se ha remarcado el efecto saludable de un consumo continuado de legumbres, junto a una reducción moderada del consumo de alimentos de origen animal, regresando a los parámetros de nuestra dieta mediterránea, más saludable y adaptada a nuestro entorno y nuestra propia cultura. Esto podría beneficiar la disminución de la diabetes, de la obesidad, de los niveles de ácido úrico y la mejora de los beneficios al tracto intestinal derivadas de un continuado consumo de legumbres.



LA AEL COLABORA CON AGRUPACIONES DE CONSUMIDORES

En diciembre, la AEL participó en una Jornada de divulgación de las legumbres en la Cooperativa Besana de Rivasvaciamadrid, en la que Lucía De la Rosa impartió una conferencia sobre la importancia de las legumbres desde el punto de vista nutricional para los socios de dicha cooperativa que centra su actividad en los productos ecológicos y de proximidad.



2. Libros y artículos científicos

LA REVISTA ARBOR DEL CSIC PUBLICA UN VOLUMEN ESPECIAL TITULADO "LAS LEGU-MINOSAS EN LA AGRICULTURA DEL FUTURO" EN CONMEMORACIÓN DEL AÑO INTERNACIONAL DE LAS LEGUMBRES

La revista Arbor del CSIC ha publicado un volumen especial titulado "Las leguminosas en la agricultura del futuro", coordinado por el profesor Diego Rubiales (IAS-CSIC), en el que participan varios miembros de la AEL, abordándose aspectos relativos al papel que juegan las leguminosas en la agricultura española y europea, aspectos nutricionales y de salud humana relativos al consumo de legumbres, la calidad y valor nutricional de las legumbres, su papel en la nutrición animal, la agrobiodiversidad como elemento de la seguridad alimentaria y ambiental, la contribución de las leguminosas a la investigación genética, la relación simbiótica leguminosas-bacteria y la historia del cultivo de la judía.



El enlace al volumen especial de la revista dedicado a las leguminosas es http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/issue/view/164/showToc y su contenido:

Presentación

2016. El año en que las Naciones Unidas nos recuerdan la importancia de las leguminosas en la dieta y en la agricultura

DIEGO RUBIALES [a310]

Artículos

Las leguminosas grano en la agricultura española y europea María José González-Bernal, Diego Rubiales [a311]

Legumbres: el pan del pobre JOSÉ IGNACIO CUBERO SALMERÓN [a312]

Aspectos de las legumbres nutricionales y beneficiosos para la salud humana CRISTINA DELGADO-ANDRADE, RAQUEL OLÍAS, JOSE CARLOS JIMÉNEZ-LÓPEZ, ALFONSO CLEMENTE [a313]

Calidad de la proteína de las leguminosas grano: un tema candente MARIA CARLOTA VAZ PATTO [a314]

Las leguminosas en alimentación animal Luis A. Rubio, Eduarda Molina [a315]

La agrobiodiversidad como elemento de la seguridad alimentaria y ambiental LUCÍA DE LA ROSA FERNÁNDEZ, JUAN FAJARDO VIZCAYNO [a316]

Historia del cultivo de la judía: su evolución más allá de las áreas de origen y domesticación

Antonio M. De Ron, Ana M. González, A. Paula Rodiño, Marta Santalla, Luis Godoy, Roberto Papa [a317]

Contribución de las leguminosas a la investigación genética. Una perspectiva histórica desde la genética mendeliana a la secuenciación masiva MARCELINO PÉREZ DE LA VEGA [a318]

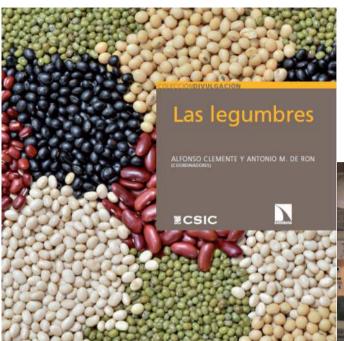
Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica

Marta Helena Ramírez-Bahena, Álvaro Peix, Encarna Velázquez, Eulogio J. Bedmar [a319]

EL LIBRO "LAS LEGUMBRES" DE LA COLECCIÓN DIVULGACIÓN ES PUBLICADO POR LAS EDITORIALES CSIC Y CATARATA

El libro Las legumbres, coordinado por Alfonso Clemente y Antonio M. De Ron, cuenta con la participación participación de 41 expertos pertenecientes a distintos organismos de investigación (CSIC, INIA, IFAPA, Universidades y otros), fundaciones y consejos reguladores que, de manera divulgativa, describen la importancia de las legumbres en la historia, en nuestra gastronomía, en la agricultura y medio ambiente, así como en la alimentación humana y animal. La ficha técnica del libro puede consultarse en: http://editorial.csic.es/publicaciones/ libros/12754/0/las-legumbres.html. Resumen del libro: A pesar de estar presentes en todas las culturas, las virtudes nutricionales, ambientales y económicas de las legumbres no son muy conocidas. Son clave para una alimentación saludable (humana y animal) por su alto contenido en proteínas, hidratos de carbono de absorción lenta, fibra, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos. Además, las investigaciones muestran que reducen ciertos factores de riesgo para la salud como niveles elevados de colesterol, la diabetes y la disfunción cardiovascular. Por otro lado, la función medioambiental de las leguminosas se basa en la fijación biológica del nitrógeno atmosférico en sus raíces, por simbiosis con microorganismos del suelo. El nitrógeno es, después del agua, el nutriente más limitante en la agricultura y la fijación de este ayuda a evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos (que desprenden gases de efecto invernadero) contribuyendo, por tanto, a limitar el cambio climático. Las legumbres también son una parte importante de la economía local. No puede olvidarse tampoco el papel relevante de las legumbres en la gastronomía, tradicional e innovadora, que supone un valor añadido para la sociedad y una satisfacción saludable para la ciudadanía. Gracias a la colaboración de importantes investigadores, este libro muestra la aportación de las legumbres a toda la cadena alimentaria y las cualidades que hacen que tengan un papes protagonista en la mitigación del cambio climático, la mejora de la nutrición, el desarrollo de la agricultura sostenible, la prevención de enfermedades y la lucha contra el hambre.

El libro ha sido presentado en Madrid, Granada, Pontevedra y Santiago de Compostela a comienzos de 2017.

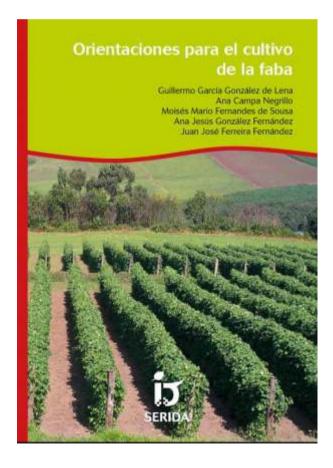






EL SERIDA PUBLICA EL MANUAL 'ORIENTACIONES SOBRE EL CULTIVO DE LA FABA'

El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) edita el manual 'Orientaciones para el cultivo de la faba', un monográfico con un contenido práctico, y a la vez riguroso sobre uno de los cultivos más tradicionales en Asturias. La publicación tiene por objeto aportar información, basándose en la experiencia de los autores, para que el productor pueda tomar las decisiones más apropiadas y maximizar el rendimiento de sus cultivos. El trabajo se estructura en ocho capítulos, que abordan aspectos como la planificación del cultivo, material vegetal, técnicas de cultivo, plagas y enfermedades, recolección, almacenamiento, así como datos económicos de las producciones. El monográfico está disponible en versión impresa, y en formato pdf a través del enlace http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=6717



Número especial de la revista MOL dedicado al Año Internacional de las Legumbres

La revista MOL, de la Sociedad de Ciencias de Galicia, ha publicado un volumen especial dedicado al Año Internacional de las Legumbres. Esta revista se publica desde el año 1993, siendo una revista de carácter científico-técnico multidisciplinar, abierta a todos los ámbitos de la Ciencia y la Tecnología. Su editor es Antonio M. De Ron (MBG-CSIC). El enlace a dicho volumen es: http://mol.scg. org.es/wp-content/uploads/2016/12/MOL-16.pdf



3. Artículos en blogs, revistas de divulgación, programas de radio y TV

- Entrevista a Alfonso Clemente en Onda Cero Ceuta.
 http://desprogresiva.antena3.com/mp_audios5//2016/01/05/384D4FCE-7FB7-4F7A-8432-FFB65137FC2A/384D4FCE-7FB7-4F7A-8432-FFB65137FC2A.mp3 (tiempo 1:05:20 1.17:10) (5 enero 2016).
- Con motivo del Año Internacional de las Legumbres, la Fundación Global Nature invitó a Lucía De la Rosa a participar en un programa que analiza el papel de las legumbres en la producción sostenible de alimentos y en las dietas saludables, su contribución a la seguridad alimentaria y los esfuerzos que se están realizando para conservar semillas de variedades locales para facilitar su utilización (http://www.ivoox.com/legumbres-audiosmp3_rf_10479000_1.html)
- Entrevista a Alfonso Clemente en el Programa Verde Verde de Canal Sur Radio en relación al Año Internacional de las Legumbres. http://alacarta. canalsur.es/radio/programa/verde-verde/135 (15 enero 2016).
- Entrevista a Alfonso Clemente en Protagonistas de la ciencia (CSIC) con motivo de la celebración del Año Internacional de las Legumbres (http://www.csic.es/hablan-los-cientificos) (http://www.leguminosas.es/los-expertos-recomiendan-tres-raciones-de-legumbres-por-semana) (Marzo 2016).

- Entrevista a Lucía De la Rosa en Agro5 del día 12 de abril de 2016 http:// mvod.lvlt.rtve.es/resources/TE_SAGRO55/mp3/6/0/1457724517606.mp3
- Entrevista a Alfonso Clemente y otros socios de la AEL en el programa Agro5 de RNE, haciéndose eco del XXVIII Foro INIA celebrado con motivo del Año Internacional de las Legumbres celebrado el 15 de Marzo 2016. El enlace es http://www.rtve.es/alacarta/audios/agro5 para los programas del día 19 y 26 de marzo de 2016.
- Entrevista a Alfonso Clemente en el programa El Radioscopio de Canal Sur Radio en relación al Año Internacional de las Legumbres. El enlace es: http://alacarta.canalsur.es/radio/programa/el-radioscopio/365. Fecha de emisión: 19 de Marzo 2016.
- Alfonso Clemente participa en el blog 20 minutos Ciencia para llevar "Comemos menos de la mitad de legumbres que hace 25 años" (http:// blogs.20minutos.es/ciencia-para-llevar-csic/2016/03/15/comemos-menos-de-la-mitad-de-legumbres-que-hace-25-anos) (Marzo 2016).
- Entrevista a Mercedes Martín Pedrosa en la pagina web de Mensa Cívica, con motivo del Año Internacional de las Leguminosas y la celebración del XXVIII Foro INIA de Colaboración Público-Privada dedicado al Año Internacional de las Legumbres. (http://mensacivica.com/leguminosas-una-revolucion-pendiente/) (Marzo 2016).
- Alfonso Clemente participa en el artículo sobre Nutrición y Legumbres publicado por el periódico La Vanguardia. La información puede ser encontrada en el siguiente enlace: http://www.lavanguardia.com/vida/20160413/401077794374/beneficios-legumbres.html (Abril 2016).
- De Ron AM. Año internacional de las legumbres. Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria de la Universidad de León. San Isidro Labrador 2016. 12-05-2016.

- De Ron AM. Pontenciencia: Feria de la Miniciencia. Junio 2016. Exposición de legumbres.
- Entrevista a Alfonso Clemente en el programa La mirilla de Onda Cero en relación al Año Internacional de las Legumbres (Agosto 2016).
- La Revista AE Agricultura y Ganadería Ecológica dedicó un número especial a las leguminosas (https://www.agroecologia.net/revista-ae25/). En dicha revista aparece los artículos El cultivo de las leguminosas, escrito por Lucia de la Rosa, Maria Teresa Marcos, Ana Maria Torres, Alfonso Clemente y Teresa Millán, y Calidad nutricional de las leguminosas y su papel en la alimentación actual, escrito por Mercedes Martín Pedrosa, así como una entrevista a Teresa Marcos, nuestra representante en la Red Rural Nacional. (Octubre 2016)
- Conferencia impartida por Alfonso Clemente con motivo del día Mundial del Dietista-Nutricionista dedicado a las legumbres. Nutrición, salud y legumbres. Valencia (Noviembre 2016).https://www.youtube.com/playlist?l ist=PLqQ3zofg9Gv9KkzSsP9IFzYOOYtVoAZQo .
- El pasado 16 de noviembre se celebró una Muestra de vídeo científico y mesa redonda con expertos en el campo de las legumbres en la Universidad de Barcelona.
 - Se adjunta el enlace del evento: http://www.ub.edu/audiovisuals/Lle-gums%21%20Un%20superaliment%20a%20l%27abast%20de%20tothom. Durante este Año Internacional de las Legumbres, la Asociación Española de Leguminosas ha colaborado de manera estrecha en diversas actividades con investigadores del Campus de Agroalimentación de Torribera (Universidad de Barcelona) (Noviembre 2016).
- Lucia De la Rosa ha participado en el 6º programa sobre "Legumbres y aves esteparias", dentro del bloque "Política Agraria, Política Natural" organizado por la Fundación Global Nature. Dicha actividad puede descargarse en los siguientes enlaces: http://www.ivoox.com/13943951; http://fundacion-

globalnature.org/pac/; https://itunes.apple.com/es/podcast/politica-agraria-politica/id1156023824?l=en

- En una serie de vídeos, protagonizados por investigadores del ceiA3 (Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario), José Ignacio Cubero Salmerón, catedrático emérito del Departamento de Genéticas de la UCO nos explica el origen de las habas y el garbanzo cultivado. Ana María Torres Romero, investigadora del IFAPA, explica el programa de Mejora que se lleva a cabo en habas. Cristina Alcántara Braña, investigadora del IFAPA, explica el programa de Mejora de Herbicidas. En los videos presentados por Josefa Rubio Moreno, investigadora del IFAPA, Teresa Millán Valenzuela, profesora Titular de la UCO, y Juan Gil Ligero, catedrático de la UCO, se explica el programa de Mejora de garbanzo. El link de acceso a los vídeos es el siguiente: http://ceia3.es/es/noticias/ciencia/1058-el-ceia3-y-su-aportacion-al-ano-internacional-de-las-legumbres
- Teresa Millán y Ana M. Torres participaron en el programa "Los reporteros" de Canal Sur dedicado a las legumbres. Se puede visualizar a partir del minuto 23 en el programa emitido el 15/10/2016. El link de acceso a los vídeos es el siguiente: http://ceia3.es/es/noticias/ciencia/1058-el-ceia3-y-su-aportacion-al-ano-internacional-de-las-legumbres
- Msión Biológica de Galicia-CSIC. CEIP O Pombal. Vigo. Exposición y cuentos de legumbres. 24-10-2016.
- Conferencia impartida por Alfonso Clemente en el Jardín Botánico de Córdoba con motivo del Año Internacional de las Legumbres. Las legumbres en un mundo sostenible (Noviembre 2016).https://www.youtube.com/watch?v=Qg2iW12LDMI
- Misión Biológica de Galicia-CSIC. Taller del Año Internacional de las Legumbres. Mes da Ciencia. Ciudad de la Cultura Gaiás. Santiago de Compostela.
 5 de Noviembre de 2016. http://www.cidadedacultura.gal/gl/evento/ano-internacional-dos-legumes

- Lucía de la Rosa y Alfonso Clemente participan en el blog 20 minutos Ciencia para llevar con el artículo titulado "La bóveda de Svalbard: el refugio ártico que guarda las semillas de todo el planeta". http://blogs.20minutos. es/ciencia-para-llevar-csic/2016/12/29/la-boveda-de-svalbard-el-refugio-artico-que-guarda-las-semillas-de-todo-el-planeta/ (Diciembre 2016).
- De Ron AM. La imporancia de las legumbres. Foro de Actualidade. Santiago
 TV. Santiago de Compostela. 15-12-2016
- Entrevista a Alfonso Clemente en el programa Las mañanas de la 1 (TVE) en relación a legumbres, nutrición y salud. (Diciembre 2016).
- De Ron AM. El Año internacional de las legumbres. Diario de Pontevedra.
 31-12-2016
- De Ron AM. Non temos unha industria que demande as sementes galegas.
 Portal GCiencia. http://www.gciencia.com/sementes-do-conecemento/antonio-de-ron-non-temos-unha-industria-que-demande-as-sementes-galegas/
- Msión Biológica de Galicia-CSIC. CULTURGAL, Ciencia á Feira. Obradoiro Ano Internacional dos Legumes. http://culturgal.com/programacion-culturgal-2016/?td=03&tm=12&ty=2016