

EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN ESPAÑA

ALUMNADO

María Ariza-Inés¹, Alejandro Belmonte-Pérez²,
Álvaro Rot-Porras¹, Matilde Soto-Carrasquilla²

INVESTIGADORES

Diego Rubiales-Olmedo³, Marcos Mateo-Fernández¹, Mario González-Romero³,
María José Cobos-Díaz³, Manuel A. Jiménez-Vaquero³.

CENTROS

1. *CES Lope de Vega SCA, Córdoba (1º Bachillerato).*
2. *IES Fidiana, Córdoba (1º Bachillerato).*
3. *Mejora Genética Vegetal por Resistencia a Enfermedades. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)*

Investigador Principal: Manuel A. Jiménez-Vaquero
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)

Profesor/Tutor: Marcos Mateo-Fernández
CES Lope de Vega SCA, Córdoba

Curso 2021/22

Abril de 2022

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. Cultivos de leguminosas	3
2.2. Inoculación.....	7
2.3. Mejora genética	8
2.4. Enfermedades en plantas.....	8
2.4.1. Oídio.....	9
2.4.2. Roya.....	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Hongos y plantas experimentales.....	14
5.2. Siembra.....	14
5.2.1. Protocolo.....	14
5.2.2. Materiales	15
5.3. Inoculación.....	15
5.2.1. Protocolo.....	15
5.2.2. Materiales:.....	17
5.4. Evaluación de la respuesta.....	17
5.4.1. Métodos de análisis	17
5.4.2. Análisis de la Roya	19
5.4.3. Análisis del Oídio.....	20
5.5. Diseño experimental.....	20
6. RESULTADOS.....	21
7. CONCLUSIÓN	23
8. AGRADECIMIENTOS	24
9. BIBLIOGRAFÍA	24

EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LEGUMINOSAS CULTIVADAS EN ESPAÑA

María Ariza-Inés¹, Alejandro Belmonte-Pérez², Matilde Navarro Agredano², Álvaro Rot-Porras¹, Diego Rubiales-Olmedo³, Marcos Mateo-Fernández¹, Mario González-Romero³, María José Cobos-Díaz³, Manuel A. Jiménez-Vaquero³.

RESUMEN

Las leguminosas son mundialmente consumidas por sus grandes beneficios alimenticios y fisiológicos para la vida humana. Sin embargo, existen patógenos que afectan a estos cultivos teniendo que emplear sustancias químicas no deseables en los cultivos. Una solución a este problema sería desarrollar plantas resistentes a enfermedades gracias a la mejora genética. En este proyecto hemos inoculado con roya y oidio investigando y trabajando sobre distintos genotipos de lentejas, garbanzos y guisantes para evaluar el efecto de estos hongos fitopatógenos en leguminosas. Basado en los avances en mejora genética nuestra hipótesis plantea que las plantas con el gen de resistencia a oídio o roya serán menos sensibles a estas enfermedades con respecto a las plantas de genotipo silvestre. Para ello sembraremos un genotipo de *Cicer arietinum*, dos genotipos distintos de *Lens culinaris* y tres genotipos distintos de *Pisum sativum*. Posteriormente inocularemos con oidio y roya los cultivos y también extraeremos una hoja que será cultivada de manera *in vitro* y que será fotografiada de manera periódica. Por último, se analizará la respuesta de las plantas a oidio y roya mediante los parámetros de severidad y del tipo de infección ayudándose del programa ImageJ para el análisis de las fotografías. Nuestros resultados indican que el genotipo 2 de guisante es la planta más resistente a la roya. Sin embargo, el genotipo 1 de guisante y el 2 lenteja son los que presentan mayor sensibilidad al ataque de roya. En cualquiera de los casos, parece que el guisante es más sensible a dicha enfermedad en comparación con la lenteja. En cuanto al oídio, los guisantes son los más susceptibles a la enfermedad. Como conclusión, podríamos seleccionar el genotipo 2 de guisante, la lenteja 1 y el garbanzo para cultivarlos como organismos resistentes a la roya, teniendo en cuenta los datos de AUDPC. En cuanto a la enfermedad causada por el oídio, el genotipo 3 de guisante y los dos de lentejas y el de garbanzo evaluados en este estudio presentan resistencia a dicho hongo teniendo en cuenta la IT.

PALABRAS CLAVE: resistencia, roya, oídio, AUDPC, lenteja, garbanzo, guisante

ABSTRACT

Legumes are consumed worldwide due to their great nutritional and physiological benefits for human life. However, there are pathogens that affect these crops, having to use undesirable chemical substances in the crops. One solution to this problem would be to develop disease-resistant plants through genetic improvement. In this project we have inoculated with rust and powdery mildew, researching and working on different genotypes of lentils, chickpeas and peas to evaluate the effect of these phytopathogenic fungi on legumes. Based on advances in genetic improvement, our hypothesis is that plants with the powdery mildew or rust resistance gene will be less sensitive to these diseases than wild genotype plants. With this goal, it was planted a genotype of *Cicer arietinum*, two different genotypes of *Lens culinaris* and three different genotypes of *Pisum sativum*. Then, the crops were inoculated with powdery mildew and rust and a leaf was also extracted and cultivated in *in vitro* conditions and photographed periodically. Finally, the response of plants to powdery mildew and rust was analyzed using the parameters of severity and type of infection (IT), using the ImageJ program to analyze the photographs. Our results indicate that pea genotype 2 is the most resistant plant to rust. However, pea genotype 1 and lentil genotype 2 are the most sensitive to rust attack. Holistically, it seems that the pea is more sensitive to this disease compared to the lentil. As for powdery mildew, peas are the most susceptible to the disease. As a conclusion, we could select pea genotype 2, lentil 1 and chickpea to grow as rust resistant organisms, considering the AUDPC data. Regarding the disease caused by powdery mildew, pea genotype 3 and the two lentil and chickpea genotypes evaluated in this study show resistance to these pathogens, taking TI into account.

KEYWORDS: resistance, rust, mildew, AUDPC, lentil, chickpea, pea

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de legumbres se remonta a las antiguas civilizaciones que las utilizaban como parte de la alimentación, eligiendo las legumbres como un cultivo imprescindible en la alimentación para combatir de esta forma la mala nutrición, al mismo tiempo que mejoraba la salud humana y la sostenibilidad del campo. En la actualidad, el 40% del consumo de legumbres se destina al consumo humano y el 30% al consumo animal. Según la FAO el consumo medio mundial de legumbres es de 7 kg por persona al año, siendo España uno de los países que más legumbres consume.

Las legumbres son una fuente esencial de proteínas, con un alto contenido en minerales: hierro y cinc. También son necesarias por su contenido en fibra, y vitaminas del grupo B. Además, tienen compuestos fotoquímicos que ejercen efectos metabólicos y fisiológicos imprescindibles para la prevención de algunas

enfermedades, como la diabetes de tipo 2 y la hipercolesterolemia, afecciones gastrointestinales, obesidad y enfermedades cardiovasculares.

Actualmente existen más de 30 especies de leguminosas cultivadas en el mundo para la alimentación humana. Las legumbres más cultivadas y consumidas en el mundo son: las lentejas, los garbanzos y las judías secas (alubias) para el consumo humano y las vezas y los yeros para el consumo animal. En este proyecto hemos inoculado con roya y oídio distintos genotipos de lentejas, garbanzos y guisantes para evaluar el efecto de estos hongos fitopatógenos en leguminosas.

2. ANTECEDENTES/FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Cultivos de leguminosas

Las leguminosas forman un amplio grupo de plantas (alrededor de 19.000 especies conocidas) perteneciente a la familia de las fabáceas "*Fabaceae*", está constituido por una gran variedad de plantas angiospermas y herbáceas. Todas las leguminosas se caracterizan por su fruto en forma de vaina, sus hojas estipuladas, su raíz pivotante y larga y su ciclo de vida anual. Algo a destacar de las leguminosas es que no podemos utilizar el término "legumbre" para referirnos a los frutos de las vainas cuyo contenido se cosecha verde para el consumo, como por ejemplo las judías. Por tanto, las leguminosas engloban tanto a las vainas que contienen granos para el consumo fresco como las que contienen semillas secas, cuyos frutos son conocidos como legumbres.

En los últimos años su cultivo ha aumentado ya que el consumo humano y animal ha ido incrementando, porque son alimentos muy saludables, ricos en fibra y en proteína. No solo ha aumentado su cultivo por su calidad nutricional, sino que también nos aporta múltiples beneficios a nivel agrícola, nos permiten mejorar la calidad de nuestro suelo, es decir, nos ayuda a que sea más fértil, nos permiten diversificar los cultivos de nuestra explotación y gracias a ellas mejoran nuestras rotaciones. Todo esto se debe gracias a la capacidad que tienen de fijar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en nitrógeno, que es uno de los minerales más importantes para las plantas.

Nuestra investigación se ha centrado en tres tipos de leguminosas:

- **Cultivo del garbanzo**

El garbanzo, con nombre científico "*Cicer arietinum*" es una leguminosa herbácea anual originaria de Turquía de unos 50 o 60 cm de altura aproximadamente, con flores blancas y vainas de entre 2 y 3 semillas redondeadas que en función de la variedad cultivada pueden ser lisas o arrugadas. El sistema de reproducción es

fundamentalmente la autogamia y en cuanto a su calidad nutricional son ricos en grasas saludables y son una fuente importante de fibra.

En cuanto a la agronomía del cultivo del garbanzo, se adapta perfectamente a los secanos puesto que no necesita mucha agua, pero el riego en general incrementa el rendimiento y calidad de la producción. A partir de 10°C el garbanzo es capaz de germinar, aunque la temperatura óptima de germinación se encuentra entre los 25°C y los 35°C. Si las temperaturas son inferiores a estas el tiempo de germinación incrementa. En relación con los suelos prefieren tierras silíceo-arcillosas que no contengan yeso, si lo contienen la cosecha puede resultar de mala calidad en general y muy malo para cocer. De igual modo, si la tierra tiene materia orgánica sin descomponer también es perjudicial en la cosecha. El garbanzo es bastante sensible a la salinidad tanto del suelo como del agua de riego por lo que cuanto más aireados estén los suelos mejor. El pH ideal está entre 6.0 y 9.0, aunque en ocasiones si el sustrato es muy ácido puede provocar enfermedades. Por último y como recomendación conviene no repetir su cultivo sobre el terreno por lo menos hasta que pasen cuatro años y preferiblemente cultivar en terrenos orientados hacia el poniente y evitar los lugares con acumulación de humedad.

Y para terminar de hablar sobre el garbanzo decir que las fechas adecuadas para sembrarlo se encuentran entre noviembre-diciembre y entre marzo-abril, y ahora vamos a realizar un resumen de los pasos que se deberían de llevar para su siembra:

-Limpiar el terreno: extraer las malas hierbas y restos de cultivos anteriores para garantizar que tus garbanzos reciban la cantidad de nutrientes adecuada. Además, es importante que sean extraídas desde la raíz para evitar que crezcan nuevamente. Y remover bien el suelo para que quede bien ventilado.

-Preparar el terreno: humedecer el terreno antes de sembrar los garbanzos, para así reducir el riesgo de que las semillas sean expulsadas como consecuencia de la fuerza del agua. Fertilizar el suelo a una profundidad de 5 centímetros y no será necesario el aporte de abono si los garbanzos son cultivados después de cereales.

-Introducir las semillas: plantar de 2 a 3 semillas a una profundidad entre 4 y 5 cm en cada montículo, luego hay que cubrirlas ligeramente. Una vez plantadas regar con abundancia el suelo.

-Seleccionar las plántulas más sanas y fuertes: las semillas germinarán a los 12 días. Si ha germinado más de una semilla en cada agujero, debemos conservar la más fuerte. Para ello hay que realizar una simple poda a nivel de suelo.

Cuando la siembra se realiza en semillero, hay que esperar a que las plántulas tengan aproximadamente unos 7-10 cm de alto. Al hacerlo, debes tener cuidado de no lastimar las raíces.

-Cosecha del garbanzo: el garbanzo se cosecha cuando las hojas se tornan amarillas y los garbanzos aún están verdes. La recolección se realiza de forma manual, sólo hay que cortar las plantas por encima del nivel del suelo, para luego apilarlas y dejarlas secar durante una semana antes de ser trilladas. Una vez cosechados, pueden conservarse en lugar seco y ventilado, o refrigerarse en contenedores de vidrio.

- Cultivo de la lenteja

La lenteja, con nombre científico "*Lens culinaris*" es una planta herbácea anual y de porte erecto perteneciente a la familia de las leguminosas, su altura suele estar entre los 40-60 cm sin llegar a sobrepasar los 70 cm, al igual que los garbanzos contienen flores blancas y su fruto se encuentra en forma de vaina pequeña que contiene entre 2 y 3 semillas pardas de medio centímetro. Además, las lentejas destacan por sus excelentes propiedades nutricionales que dan un gran aporte de hierro, proteínas, fibra e hidratos de carbono, por esto su cultivo y su consumo tanto humano como de alimento para el ganado está incrementando en los últimos años.

En relación a la agronomía del cultivo de la lenteja, al igual que los garbanzos presentan una buena adaptación y tolerancia a la sequía, pero se desarrolla mejor en terrenos húmedos con un buen drenaje. Sin embargo, el exceso de agua puede provocar que se pudran las raíces, por lo que es recomendable reducir los riesgos durante el invierno. Para este tipo de planta y para poder controlar adecuadamente el consumo de agua la opción ideal de riego es el goteo. En cuanto a las temperaturas el garbanzo necesita de 15 a 21°C para su germinación, pero la temperatura ideal para su desarrollo se encuentra entre los 6 y los 28°C, es decir, requiere de una buena cantidad de luz solar pero controlando la exposición al sol y la intensidad lumínica. El suelo más adecuado para el cultivo de lentejas es uno arenoso, profundo, fresco, rico en materia orgánica y suelto, permitiendo la retención de la humedad, pero a la misma vez eliminando el exceso. También es aconsejable el uso de abono orgánico para que el suelo sea esponjoso. Al igual que el cultivo de los garbanzos es un cultivo sensible a la salinidad y requiere de un suelo con unos niveles de pH comprendidos entre 5.5 y 9.

También decir que como las lentejas son un cultivo de invierno y se adaptan muy bien a los climas frescos su periodo de siembra es a finales de otoño para poder aprovechar las lluvias.

Y para terminar de hablar de la lenteja vamos a realizar un resumen de los pasos que deberíamos de seguir para su siembra.

En general la siembra de la lenteja es parecida a la del garbanzo, los primeros pasos de la limpieza del terreno y la preparación son iguales, tan solo cambia que a la hora de fertilizarlo hay que esparcir un poco de humus por el suelo para mejorar la calidad antes de sembrar las semillas. A la hora de introducir la semilla también coincide con

los garbanzos, hay que introducirlas a unos 5 cm de profundidad excepto las que son de menor tamaño y cubriéndolas ligeramente. Sin embargo a la hora de regar si varía en cuanto al garbanzo, regaremos cuando al introducir un lápiz en la tierra veamos que al sacarlo sale seco, señal de que necesitan ser regadas. Y por último hay que fertilizar regularmente la planta y preparar un enrejado para su completo desarrollo. Si se realizan todos estos pasos adecuadamente para finales de primavera o en verano se podrá realizar la recolecta de las lentejas, para ello tenemos que fijarnos que la planta haya alcanzado unos 60 cm de altura y que las vainas presenten un color amarillo. Para cosechar la lenteja, basta con cortar las vainas, colocarlas sobre una lona y pisarlas con cuidado para quebrarlas.

Luego, se retiran las lentejas y hay que conservarlas en un lugar seco y fresco para su consumo.

- Cultivo del guisante

El guisante, con nombre científico "*Pisum sativum*" es una planta trepadora perteneciente a la familia de las leguminosas, que al igual que sus semillas puede ser conocida por diferentes nombres, como por ejemplo chícharo, petipúas o arvejas dulces, entre otros. Respecto al desarrollo vegetativo existen unas variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado, que dan lugar a tres tipos de variedades, las enanas cuya longitud del tallo es de entre 35 y 60 cm, las semi enanas cuya longitud del tallo es de entre 60 y 70 cm y las trepadoras con una longitud de su tallo de entre 100 y 180 cm. Las vainas de esta leguminosa suelen ser cilíndricas y contienen de 3 a 12 semillas verdes de diferentes formas y tamaños. Además, los guisantes son una buena fuente de proteínas, minerales y fibras, que pueden consumirse tanto en fresco como por ejemplo en ensaladas como cocidas en guisos o salteados.

En cuanto a la agronomía del cultivo del guisante, se desarrolla bien en un clima templado, húmedo y con un frío moderado, al contrario que los garbanzos y las lentejas no soportan el calor en exceso ni las sequías. Los suelos requieren de cierto grado de humedad y los guisantes al igual que las lentejas utilizan el riego por goteo para evitar el encharcamiento por exceso de agua, que podría hacer que las semillas se pudrieran. El crecimiento de las plantas se detiene cuando las temperaturas se encuentran por debajo de 8°C y si las temperaturas se encuentran por encima de 35°C la planta vegetara bastante mal, las temperaturas ideales para su desarrollo se encuentran entre los 15 y 22°C. Generalmente deben estar al menos 6 horas al día a pleno sol, procurando que el clima no sea muy caluroso. Los guisantes no son muy exigentes con respecto a la calidad del suelo. Los mejores son los que poseen buena cantidad de materia orgánica y además son frescos, mullidos y están bien drenados. No le convienen los suelos muy calcáreos y secos, ni los excesivamente ácidos y húmedos. En este caso el nivel del pH no debe ser inferior a 6.5. El periodo de siembra de estas plantas varía un poco en función de cómo sea el clima donde se vaya cultivar

y de la variedad que se trate, pero generalmente el guisante se suele sembrar en otoño entre octubre y diciembre.

Y para terminar de hablar sobre el guisante vamos a realizar un resumen de los pasos que se deben seguir para su siembra.

En general la siembra del guisante es bastante similar a la de las lentejas y los garbanzos, los primeros pasos de limpieza y preparación del terreno son iguales. Mientras que a la hora de introducir las semillas primero hay que dejarlas en remojo durante una noche para asegurar una buena germinación, a continuación, se realizan los agujeros para introducir las semillas, pero esta vez tendrán una profundidad de 3 cm o menor, y tendremos que colocar un número de tres o cuatro semillas en cada agujero. Y ahora si al igual que en los anteriores casos hay que cubrir las semillas ligeramente y luego regar suavemente para que la semilla no quede expuesta. En algunas variedades es necesario ir tutorando las plantas durante el crecimiento del guisante, esto se hace para favorecer la exposición de la planta a la luz solar y para que cuente con una adecuada ventilación. La realización de un buen tutorado permite que las vainas se desarrollen adecuadamente. Y por último para saber cuándo los guisantes están listos para ser cosechados, sólo hay que inspeccionar las plantas con regularidad, palpando las vainas con delicadeza y poniendo especial atención a los bultos de los guisantes formados. Normalmente las vainas se recolectan cuando estén rellenas, pero no sean demasiado grandes. Generalmente necesitan entre 58 y 72 días para la recolecta, pero esto varía en función de la variedad. En la mayoría de los casos la cosecha se da de forma mecanizada, aunque también se puede realizar manualmente.

2.2. Inoculación

El término inocular tiene un origen etimológico procedente del latín, para ser más exactos proviene del verbo latino “inoculare” que significa causar mal de ojo y que está formado por dos componentes léxicos, el prefijo –in que en este caso significa “hacia el interior” y el sustantivo oculus que puede traducirse como ojo. El verbo inocular tiene varios usos, pero el que a nosotros nos interesa es el relacionado con el campo de la medicina y de la biología, en este caso significa implantar una sustancia con gérmenes de una determinada enfermedad que se desarrollará y se reproducirá en un organismo, aunque nosotros en concreto nos hemos centrado en las plantas. Para poder entender mejor el concepto algunos sinónimos de inocular podrían ser contagiar, infectar o transmitir, mientras que algunos antónimos podrían ser sanar, curar o desinfectar.

Como ya he dicho antes nosotros nos vamos a centrar en la inoculación en las plantas, para inocularlas hay diferentes maneras de hacerlo y pueden ser inoculadas con distintos inóculos pero en nuestro caso utilizaremos esporas. Como ya hemos nombrado anteriormente en su definición la inoculación en plantas se realiza con el

fin de producir la enfermedad que se busque implantar a las mismas o también se puede realizar en casos de controladores biológicos, para protegerlas del ataque de patógenos. Para que la inoculación se pueda producir correctamente necesitamos una serie de requisitos, lo principal tenemos que disponer de un inóculo viable y ponerlo en contacto con las plantas que seleccionemos, obviamente estas plantas tienen que estar en un estado adecuado para que no se produzcan fallos y una vez estén inoculadas, las plantas tienen que mantenerse en condiciones de humedad y a las temperaturas adecuadas para que ese inóculo colonice la planta y se produzca la enfermedad correctamente. Otro factor muy importante es conocer la cantidad mínima de inóculo necesaria para producir infección en la planta, ya que en un ensayo en el que queramos inocular más de una planta debemos inocularlas a todas de la misma manera y con cantidades similares. En general se suele inocular con el fin de probar patogenicidad o para evaluar el efecto de alguna medida de control, como por ejemplo el de un fungicida o un producto biológico. En el primer caso si la inoculación no se realiza de manera correcta llegaremos a resultados incorrectos en el diagnóstico y en el segundo caso se espera que las plantas sin tratar manifiesten la enfermedad, mientras que las plantas tratadas, contando con que el tratamiento sea efectivo, los niveles de enfermedad sean menores.

2.3. Mejora genética

La mejora genética de plantas constituye un conjunto de técnicas y conocimientos de orígenes diversos a través de las cuales se trata de obtener variedades vegetales con mejores características para su cultivo a partir de otras preexistentes.

Por un lado, la mejora tradicional ha consistido en cruzar plantas que observábamos que tenían características favorables para el cultivo, como por ejemplo mayor rendimiento, mejor contenido nutricional, mejor adaptación al medio al medio. Para ello, necesitábamos invertir mucho tiempo y los cruces se realizaban de manera visual y en muchas veces aleatorios, por lo que no era sostenible.

Con la mejora genética conseguimos obtener plantas con mayor rendimiento, con mejores cualidades nutricionales, resistentes a patógenos, a la temperatura, a la sequía etc, de una manera directa y casi inmediata. Esta mejora genética se consigue gracias al conocimiento en fisiología vegetal, agricultura y especialmente en el avance tecnológico en biología molecular y en la genética de poblaciones.

En la mejora genética se realiza una colección de genotipos a partir de variedades silvestres y cultivadas y se comienza con la búsqueda de fuentes de resistencia mediante ensayos que tratan de explicar el mecanismo de dicha resistencia y así encontrar los genes responsables.

2.4. Enfermedades en plantas

Las plantas desarrollan una serie de síntomas que nos indican que sus células han sido dañadas por algún agente infeccioso tales como bacterias, virus, insectos, nematodos u hongos. Algunos de estos síntomas son:

- flores marchitas
- tallos mustios
- defoliación
- clorosis
- tejidos secos y quebradizos
- frutos pequeños o pocos frutos
- ciclo más corto
- mordeduras
- manchas
- etc.

Para detectar dichos síntomas nos basamos en pruebas de observación visual o con ayuda de una lupa o microscopía. Además, hoy en día y gracias al avance de la tecnología podemos utilizar pruebas bioquímicas, de secuenciación, PCR o la técnica ELISA entre otras.

Los métodos de control de estas plagas consisten en el uso de insecticidas, herbicidas, fungicidas o fertilizantes. Sin embargo, no son métodos muy recomendados hoy en día y por eso se utiliza la mejora genética incorporando genes de resistencia a estos patógenos y así evitar añadir productos químicos no deseados a los cultivos.

2.4.1. Oídio

El oídio que también puede ser conocido como ceniza o moho blanco es una enfermedad en las plantas producida por diversas especies de hongos fitopatógenos biotrofos de varios géneros, aunque los que a nosotros nos interesan son aquellos que afectan a las leguminosas y estos son los del género *Erysiphe*.

Como ya hemos dicho son hongos fitopatógenos biotrofos por lo que su desarrollo suele ser epífito, es decir, que se desarrollan sobre la superficie de la planta y poseen unas estructuras especializadas que se encargan de penetrar en las células del órgano atacado y obtener los nutrientes necesarios provenientes del huésped, estas estructuras reciben el nombre de haustorios. Su desarrollo externo, unido a una elevada producción de conidios, les confiere una especie de polvo blanco algodonado que constituye el principal síntoma de este hongo. Este polvillo son masas de esporas que ha producido el propio hongo en su desarrollo y que puede observarse disperso o coalescente en todas las partes aéreas de la planta, tallos, peciolo, frutos (aunque solo en ataques muy fuertes), etc aunque mayormente afecta a las hojas y sobre todo a las más jóvenes, este polvo puede encontrarse tanto en el envés como en el haz de la hoja. El tamaño de las manchas de polvo va aumentando poco a poco hasta llegar

a cubrir todo el aparato vegetativo de la planta, además a medida que pasa el tiempo los órganos afectados amarillean y terminan por secarse y morir. Incluso en casos con niveles de afectación leves, el rendimiento de las plantas parasitadas disminuye debido a las modificaciones fisiológicas que reducen la capacidad de asimilación fotosintética, esto se puede ver reflejado en la producción de los frutos que por culpa del hongo pasan a ser pobres en azúcar.

En cuanto a las condiciones que favorecen la aparición del oídio en las plantas podrían ser los climas secos con noches frescas (humedad), la mala ventilación o un alto contenido de nitrógeno. Y el principal encargado de transportar los conidios para que germinen en nuevas plantas y se siga dando el ciclo de infección es el viento.

En resumen el oídio se trata Se trata de un hongo cuyo ciclo vegetativo genera micelio y cleistocitos , siendo estos la estructura reproductiva dónde se encierran las esporas, durante el invierno, y micelio desarrollado y una serie de conidios encadenados durante el verano. A partir de primavera y durante el verano es cuándo se produce la propagación de las ascosporas dando paso a la propagación de la infección. Dicha infección es capaz de mantenerse hasta el otoño. Por tanto, la infección fúngica ocurrirá en las células epidérmicas pero encontraremos las esporas en la superficie de la planta.

Para terminar de hablar del oídio vamos a decir algunas de las medidas preventivas que se pueden tomar para evitar su desarrollo:

- Destrucción de las plantas espontáneas y rastrojos para que haya una mejor ventilación.
- Siembras tardías para evitar que no se den las condiciones idóneas para el hongo.
- Limitar el aporte de nitrógeno ya que un alto contenido de este favorecería la aparición.
- Evitar parcelas fácilmente encharcables para no acumular humedad.

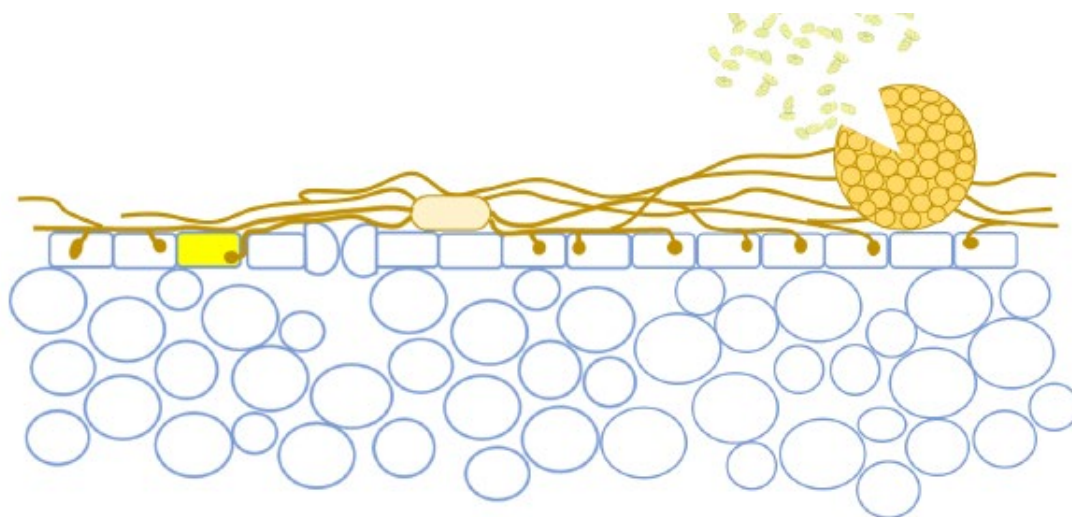


Imagen 1. Colonización del oídio en la epidermis de la hoja y posterior producción de esporas.

2.4.2. Roya

La roya es una enfermedad producida en las plantas por un conjunto de especies de hongos fitopatógenos biotrofos que afectan a especies o grupos concretos de plantas aunque a veces una misma especie puede afectar a varias, a día de hoy hay más de 8.000 especies distintas como por ejemplo la roya de la judía, del guisante o del haba.

Al igual que el oídio la roya es un hongo fitopatógeno biotrofo por lo que necesita de su huésped para poder desarrollarse y sobrevivir ya que de él es de donde capta todos los nutrientes necesarios. En general la roya tiene bastante parecido con el oídio pero también son muchas las características diferentes, por ejemplo la parte aérea de la planta también se cubre de manchas pero en este caso son herrumbrosas (color rojizo), redondas en las hojas y alargadas en tallos y pedúnculos, aunque al igual que en el oídio las manchas surgen primero en las hojas jóvenes y basales y con el tiempo se van extendiendo hacia las hojas superiores, tallos e incluso vainas. En concreto estas manchas son pequeñas y cloróticas, y además están rodeadas de un halo amarillo o verde sobre las que se forman las pústulas de color marrón anaranjado generadoras de urediosporas. Una vez estén generadas las urediosporas si las condiciones son favorables reinfectarán la planta en un ciclo que se repetirá hasta el final del periodo vegetativo. Si las infecciones acaban siendo graves posiblemente causaran la deshidratación de los tallos, la caída de las hojas y el aborto de flores, en el peor de los casos la planta quedará totalmente seca. Por último, cuando concluye el crecimiento del cultivo o las condiciones ambientales ya no son favorables, se forman pústulas más largas de color negro que producen teliosporas, que son unas esporas resistentes capaces de sobrevivir hasta la primavera. En definitiva, esta enfermedad afecta disminuyendo la superficie de la hoja con capacidad fotosintética por culpa de las manchas que se crean y por tanto afecta en la absorción de nutrientes para la planta.

En cuanto a las condiciones favorables para el desarrollo de la roya son parecidas a las del oídio ya que necesitan humedad y principalmente se dan en primaveras húmedas y templadas. También decir que los mayores propagadores de la enfermedad son el viento, el agua, los insectos y las aves. Y para terminar de hablar de la roya vamos a decir algunas de las medidas preventivas que se pueden tomar para evitar su desarrollo, aunque son muy parecidos a las del oídio:

-Aumentar los marcos de siembra para favorecer la ventilación.

-Evitar el exceso de nitrógeno y los riegos nocturnos para no acumular humedad.

-Sembrar al menos a 500 metros de las parcelas donde se ha manifestado la enfermedad.

-Eliminar los restos de la cosecha, los rebrotes y las leguminosas adventicias que favorecerán a que haya una mejor ventilación.

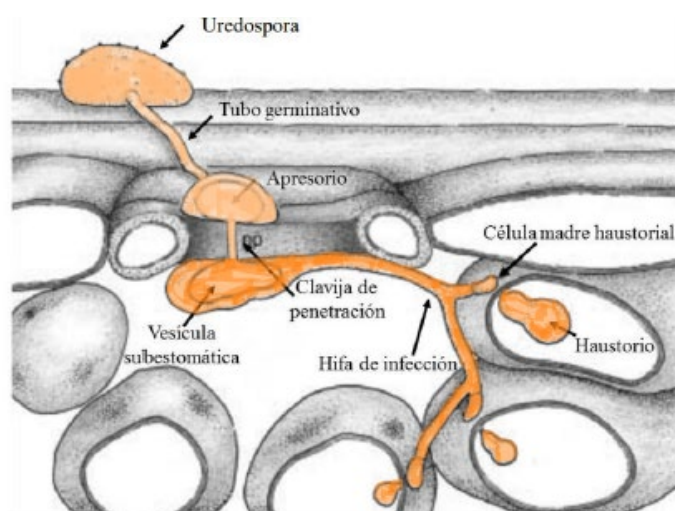


Imagen 2. Colonización y germinación de la espora de la roya.

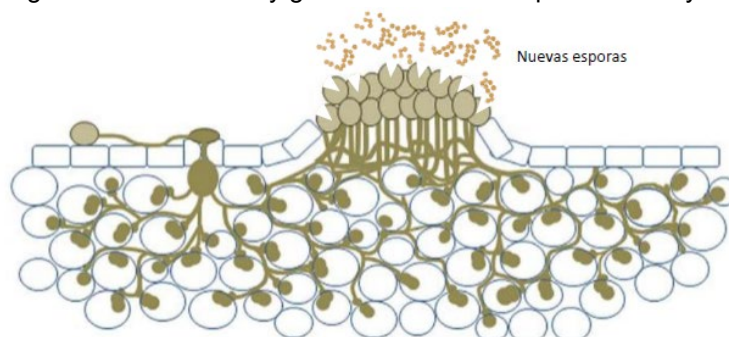


Imagen 3. Producción y liberación de esporas de roya.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Basado en los avances en mejora genética nuestra hipótesis plantea que las plantas con el gen de resistencia a oídio o roya serán menos sensibles a estas enfermedades con respecto a las plantas de genotipo silvestre.

Los objetivos del presente proyecto son:

- Conocer los aspectos básicos de los cultivos de leguminosas, mejora genética y enfermedades de plantas tales como la roya y el oídio.
- Familiarizarse con las colecciones de genotipos vegetales.
- Adquirir destreza en la siembra de distintas variedades de plantas.
- Realizar inoculaciones de planta u hoja con roya y oídio.
- Usar distintos métodos de evaluación de la respuesta de las plantas a enfermedades.

4. PLANIFICACIÓN DE LAS SESIONES

Primera sesión: visita por las instalaciones e introducción al trabajo que vamos a realizar. Al final, sembrar en macetas las diferentes leguminosas (3 genotipos distintos de guisantes, 2 de lenteja y 1 de garbanzo)

Segunda sesión: inoculación con aislados hongos, la roya que es un conjunto de especies de hongos fitopatógenos biotrofos que afectan a especies o grupos concretos de plantas y el oídio, enfermedad de plantas producida por diversas especies de hongos fitopatógenos biotrofos de varios géneros, los que afectan a leguminosas son del género *Erysiphe*. Realizamos el diseño del experimento, a continuación preparamos la muestra y los utensilios que vamos a usar ya que para cada hongo son distintos, y por último, inoculamos los hongos por separado y de diferente manera.

Tercera sesión: evaluamos la severidad y el tipo de infección (IT) de las plantas vivas. Por otro lado evaluamos las hojas cortadas inoculadas con roya para obtener la curva de infección de cada genotipo. Este dato se obtiene haciendo evaluaciones diarias del número de pústulas que aparecen en una hoja (o planta) durante todo el ciclo de infección, de 8 a 14 días después de la inoculación. Para esto usaremos ImageJ.

Cuarta sesión: elaboración de los resultados y discusión de los mismos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Hongos y plantas experimentales

Hongos utilizados para el estudio:

Roya (*Uromyces pisi*): Se depositan esporas en las plantas siendo estas infectadas, pudiéndose observar en la superficie, por la formación de pústulas (uredia) en el caso de infección, como carácter más significativo de este hongo, dichas plantas infectadas generan menor cantidad de tallos secundarios y en consecuencia menos semillas e incluso en casos de infección extrema, la planta puede llegar a morir

Oidio (*Erysiphe pisi*); Popularmente se le llama blanquilla o cenicilla, siendo su principal característica la capa harinosa aparente en la planta infectada, pudiendo aparecer por factores como la atmósfera, el abono utilizado (con excesivo porcentaje de nitrógeno), además de humedad.

Plantas y genotipos utilizados para el estudio:

Garbanzo (*Cicer arietinum*): **Un solo genotipo utilizado.** Siendo este una especie de leguminosa adaptable en todos los continentes, herbácea y pudiendo alcanzar 50 centímetros aproximadamente. Flores de colores violeta o blanco desarrollando al final en la vaina un total de 2 o 3 semillas, con una periodicidad anual. El garbanzo se trata de una planta anual diploide, con reproducción autogámica.

Lenteja (*Lens culinaris*): **Dos genotipos utilizados.** Se trata de una especie de leguminosa herbácea pudiendo alcanzar los 40 centímetros, con tallos débiles, estriados y ramosos, con una hoja oblonga. Flores blancas con venas moradas formando un fruto con dos o tres semillas de color pardo finalmente. Siendo este relativamente tolerante a la sequía y properable en todos los ambientes.

Guisante (*Pisum sativum*): **Tres genotipos utilizados.** Propia de la cuenta mediterránea, pero muy extendida por todos los continentes, siendo esta una especie de leguminosa herbácea, con un sistema vegetativo poco desarrollado aunque la raíz es capaz de profundizar significativamente. La característica que se puede observar a simple vista se trataría de que actúan con función de enredadera para sujetarse al ser tan endebles formando una estructura, necesitando una especie de guías .

5.2. Siembra

5.2.1. Protocolo

El cultivo de este tipo de plantas se estima que se comenzó a realizar desde el neolítico junto a los cereales, cuando se comienza a realizar este tipo de actividades complementarias a la caza y se comenzó a practicar el sedentarismo.

En cuanto a la siembra, cada planta al ser un grupo tan extenso, necesitaría una siembra diferente debido a la característica de estas de fijación de nitrógeno mediante la bacteria *Rhizobium leguminosarum*, pero escogimos plantas cuáles su siembra era semejante. Para comenzar con ella, se extrae porciones de tierra almacenadas en macetas de un metro cuadrado, en cuanto a las características de la tierra, no tiene porque ser demasiado selecta debido a la facilidad de crecimiento en cualquier continente como antes he nombrado, pudiendo así recoger la tierra en cualquier campo donde no esté muy transitado o contaminado.

Posteriormente para la plantación se debe coger una semilla por maceta de metro cuadrado e introducirla con suavidad, con una profundidad mínima de largo de una uña para que esta pueda crecer de manera correcta, como dato importante es que no se debe regar inmediatamente después de su plantación pero si tener un regado continuo posterior para evitar que se seque.

5.2.2. Materiales

- Tierra de mantillo
- Seis semillas, una de garbanzo, dos de lenteja y tres de guisante. Teniendo estas diferentes genotipos con respecto a las semillas de la misma planta.
- 48 macetas para plantar las semillas y así obtener diferentes posibles resultados con todas las semillas.(8 de cada tipo)
- Marcadores, para diferenciar las plantas y genotipos (marcándolos de la siguiente manera: guisante 1, guisante 2, guisante 3...)
- Utensilio de riego

5.3. Inoculación

5.2.1. Protocolo

En primer lugar existe un llamado "Proceso de selección" en el que, se observan las diferentes muestras obtenidas y se escogen las que van a ser utilizadas en la inoculación, atendiendo a las pautas de:

- El tamaño de la muestra sea adecuadamente alta
- Debe ser una muestra homogénea, es decir que debe haber sido cultivada en las mismas condiciones que las demás muestras, todas las muestras seleccionadas deben tener características similares, y todas las hojas tienen que ser de un similar tamaño y forma, que sean de la misma "edad".
- Todas las muestras escogidas deben ser aleatorias siempre y cuando cumplan los factores anteriores, no debes atender a posición o si la muestra es más o menos agradable a tu vista.

Posteriormente debemos diferenciar los dos tipos de inoculación que son utilizados, siendo estos diferentes para la roya y el oidio.

Inoculación Roya

Al obtener la muestra de las esporas del hongo, se debe mantener en el recipiente que se encontraba en frío, a unos -80°C , para acto seguido añadirlo en un vaso de precipitado a una cierta temperatura, concretamente entre $60-70^{\circ}\text{C}$ para producir un choque térmico y que al subir la temperatura del mismo se mezcle con un porcentaje de polvos de talco, midiendo todas las cantidades meticulosamente en una balanza de precisión. A continuación se procede a la mezcla en el instrumento de inoculación, y su posterior esparcimiento siguiendo estas indicaciones:

- Con precaución y ligeramente inclinado y con notable acercamiento a las muestras se presiona alegremente al globo con el que cuenta el instrumento para introducir la presión necesaria y posterior a esto se presiona con suavidad para no esparcir todas las esporas de una vez, moviéndote delicadamente alrededor de las muestras para esparcirlas homogéneamente, hasta terminar con toda la mezcla de esporas y talco repartidas en las muestras.

Al final del proceso se debe mantener 24 horas en una situación de humedad y en un lugar oscuro para garantizar el crecimiento e infección.



Imagen 4. Inoculación de la esporas de roya por soplado directo de esporas con talco.

Inoculación Oidio

En esta ocasión la inoculación se produce con una hoja ya infectada con el hongo y mediante una sopladora se esparcen las esporas, con suavidad, a través de un orificio introducido en un cilindro de metal, aunque podría tratarse de cualquier otro material. La mezcla va desprendiéndose sobre el cilindro hasta el final que se encuentran las mezclas anteriormente preparadas en un medio de disolución con Agar donde se adhieren ligeramente para quedar intactas.

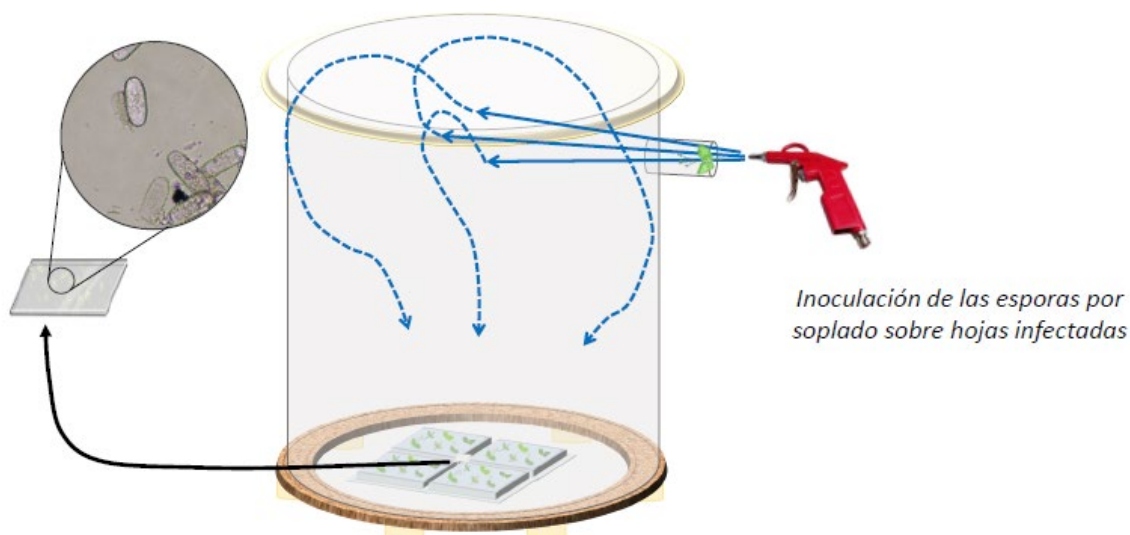


Imagen 5. Inoculación de las esporas de oídio por soplado sobre hojas infectadas. Se coloca un portaobjetos para posteriormente realizar un conteo de esporas y comprobar la efectividad de la inoculación.

5.2.2. Materiales:

Roya

- Balanza de precisión
- Polvos de talco
- Esporas de Roya
- Instrumento de esparcido
- Muestras que se van a utilizar

Oidio

- Placa de disolución con Agar
- Muestras que se van a utilizar
- Marcadores para diferenciar las muestras
- Cilindro para el esparcido
- Sopladora

5.4. Evaluación de la respuesta

5.4.1. Métodos de análisis

Frecuencia de infección

A partir de los datos de **Frecuencia de Infección** que obtuvimos al analizar con el *software ImageJ* (a partir de las fotografías) las placas de hojas infectadas con roya, hemos calculado la media aritmética de las cuatro repeticiones independientes, para

cada uno de los genotipos y para cada día; este dato lo hemos representado con respecto al tiempo (días tras la inoculación) para construir la **Curva de Infección**. A continuación, hemos calculado con su correspondiente fórmula el parámetro **AUDPC** (Área Bajo la Curva de Infección) para obtener un dato individual que nos permita comparar entre genotipos.

Fórmula AUDPC:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Fórmula AUPDC. Donde: y_i equivale al valor del parámetro (la media de la frecuencia de infección) en un día determinado, y_{i+1} equivale al valor en el día siguiente; t_{i+1} es el día siguiente al calculado y t_i es el día en cuestión.

Severidad

A partir de los de evaluación visual de **Severidad (% cobertura)**, que evaluamos sobre las plantas infectadas con roya, también hemos calculado la media aritmética de cuatro repeticiones independientes, para cada genotipo estudiado.

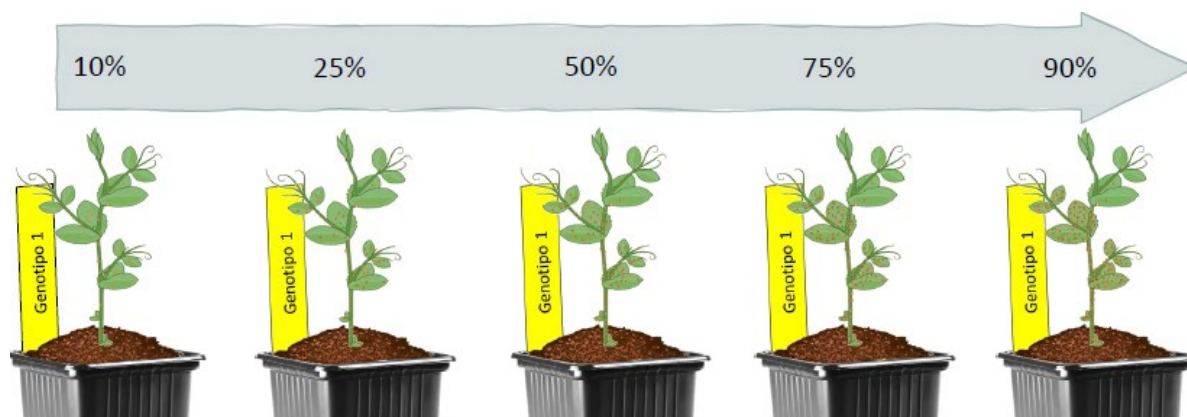


Imagen 6. Representación de plantas infectadas con roya apreciando distintos porcentajes de severidad. Imagen tomada como referencia para la evaluación visual de la severidad en roya.

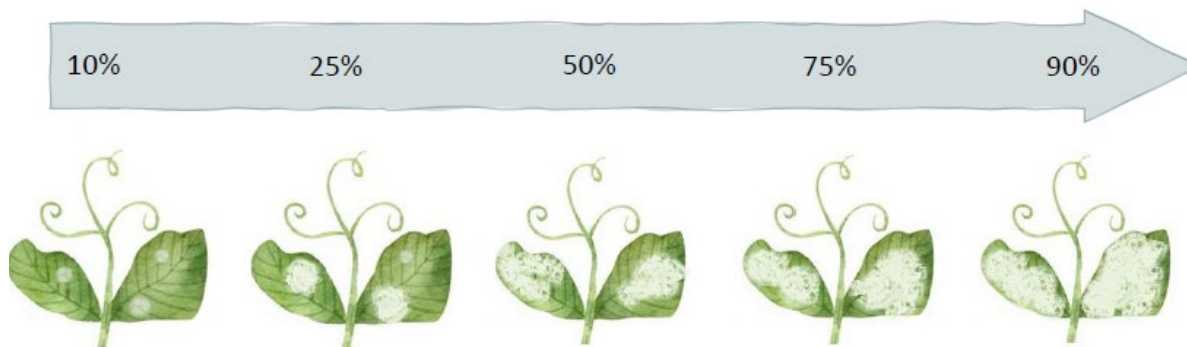


Imagen 6. Representación de plantas infectadas con roya apreciando distintos porcentajes de severidad. Imagen tomada como referencia para la evaluación visual de la severidad en roya.

Tipo de infección (IT)

A partir de la evaluación visual del **Tipo de Infección (IT)** hemos discutido cuál de las observaciones sería más adecuada, y en los casos en que no hemos encontrado un consenso, hemos utilizado la moda (el dato más repetido por las distintas repeticiones). Hemos seguido el mismo procedimiento para los datos de **Tipo de Infección (IT)** que obtuvimos al observar las placas de hojas inoculadas con oídio. En este caso, no se pudieron obtener resultados de Severidad, porque en las hojas que se desarrolló el hongo, su crecimiento fue muy leve y no permitía observar el % de cobertura respecto al total de la hoja.

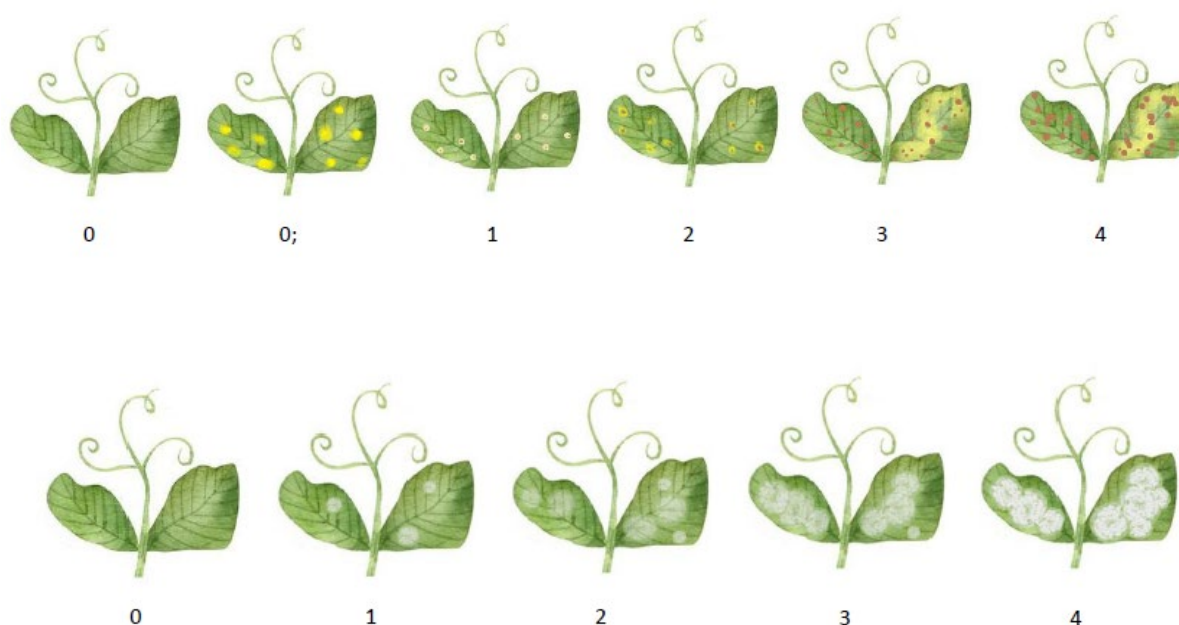


Imagen 7. Modelo guía para la observación visual el tipo de infección tanto en oídio como de roya.

5.4.2. Análisis de la Roya

En primer lugar nos fijamos en que estamos viendo, que en el caso de la roya, estaríamos viendo un número de pústulas que más tarde analizaremos, repartidas por el tallo y hojas, además pudiendo observar que la planta ha ido generando hojas y creciendo debido a que hay una sección de la planta que no se encuentra infectada. Estas pústulas se forman a partir de una un proceso de infección y posterior colonización, para que cuando la planta ya no pueda subsistir con el hongo implantado se producirá un proceso de esporulación donde las esporas se distribuirán.

Tras analizar lo visible, evaluaremos la severidad de la enfermedad, que básicamente se define como un porcentaje de la superficie de la planta que ha sido cubierto por pústulas.

Así como la evaluación de la severidad, de forma similar se evalúa el tipo de infección (IT), tratándose de un conjunto de síntomas por la acción del agente patógeno y la respuesta ante la infección.

5.4.3. Análisis del Oídio

Del mismo modo que anteriormente se realiza una observación de la planta para ver de forma visual, cómo ha actuado el agente patógeno sobre la planta, pudiéndose observar su blanquecina capa por encima como carácter principal y al igual que con la roya se realiza posteriormente la evaluación de la severidad, teniendo en cuenta el porcentaje y el tipo de infección (IT) que es de forma gradual de menor a mayor infección.

5.5. Diseño experimental

En este proyecto antes de proceder a la realización de las prácticas, indagamos sobre la anatomía y aumentamos nuestro conocimiento de las leguminosas, de lo que se encarga la mejora genética, además de los tipos de enfermedades que vamos a inocular y sus características, teniendo en cuenta; tipo de planta, virus que se encarga de la infección, síntomas y pruebas analíticas sobre las siguientes plantas, siguiendo los procedimientos a continuación nombrados.

Posteriormente procedemos a la siembra en macetas con una tierra de mantillo de cualquier tipo y solo hay que llevar el procedimiento siguiente para la siembra:

- Extraer una semilla de la bolsa y solo introducir una por maceta
- Introducir la semilla con el dedo presionando ligeramente, acto seguido dejarlo solo hasta la profundidad de tu uña para una proliferación perfecta.
- Después de la siembra se debe regar periódicamente pero acto seguido de la siembra no es recomendado.

Posteriormente al crecimiento de las plantas, tenemos el proceso de inoculación, en el que se debe ser meticuloso e intentar esparcir el hongo por todo el conjunto de macetas, teniendo en cuenta un proceso diferente para cada una de las enfermedades inoculadas, teniendo en cuenta el proceso de selección previo para observar las plantas aptas y las que no lo son para la inoculación.

Tras estos procesos se realiza una evaluación de la respuesta tras dos semanas después de la inoculación, teniendo en cuenta la severidad (porcentaje de la superficie que contiene pústulas), e IT (tipo de infección, refiriéndose al conjunto de síntomas que pueden posiblemente observarse, tras la acción del hongo, usando para

La observación de pústulas y síntomas un programa utilizado por un compañero del IAS CSIC, con una funcionalidad brillante y utilidad excepcional.

Por último pasamos a la identificación de fuentes de resistencia habiendo comparado los datos tomados tras la Interpretación de los datos obtenidos tras analizar el IT y la severidad usaremos una hoja de word Excel para la posterior comparación y exposición de los resultados.

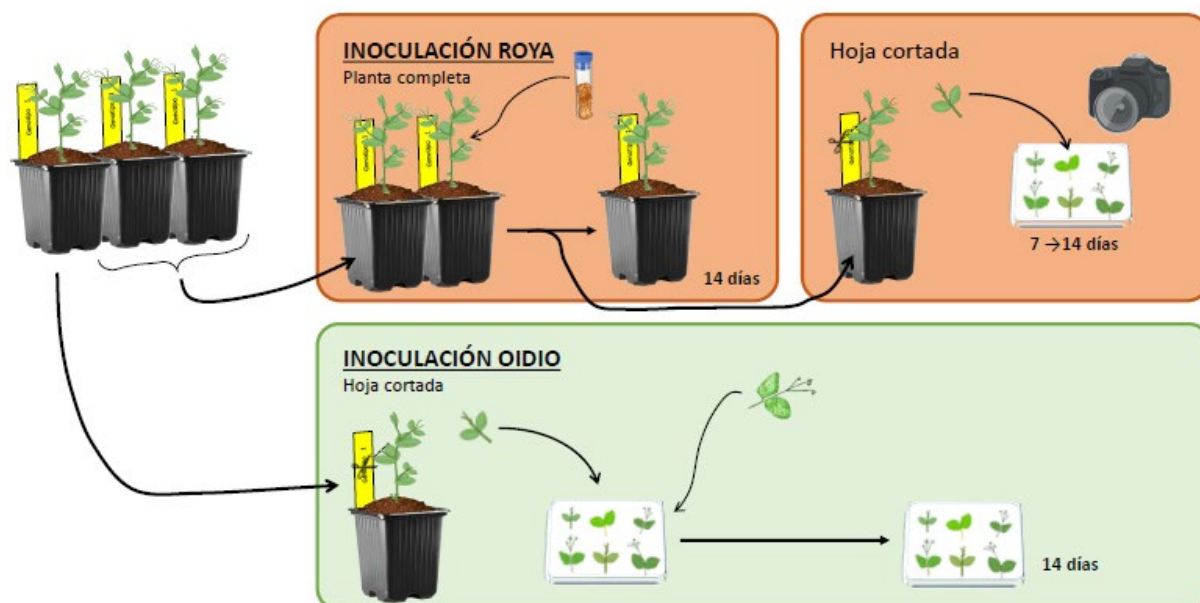


Imagen 8. Esquema del diseño experimental de cultivo de leguminosas e inoculación con roya y oídio.

6. RESULTADOS.

La figura 1 muestra los resultados de la frecuencia de infección sufrida por cada genotipo estudiado de guisante tras ser inoculados con roya. En ella, podemos observar que el guisante con genotipo 1 ha resultado más afectado que el guisante 2, ya que este último en su día 13 tras la inoculación, padece una media de infección de 0,00. Nos asombra el repunte que se produce en el día 10 del guisante 1, en el día 13 después de la inoculación con roya, logra una media de infección de 8,97 siendo así el genotipo más afectado de todos los genotipos y plantas evaluadas en este estudio. En el día 13 tras la inoculación, el guisante 3 alcanza una media de infección de 3,01.

Por lo tanto, podemos determinar que el guisante 1 ha sufrido una infección mucho más elevada que en el guisante con genotipo 2 y 3. El número de pústulas en el guisante 1 es más elevado que en el resto de genotipos del guisante.

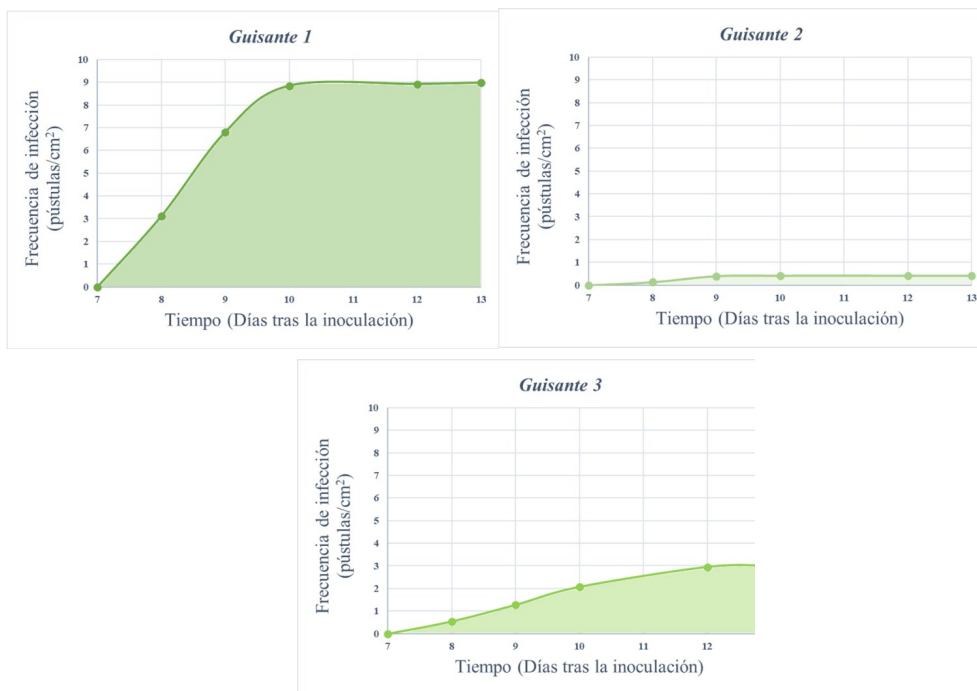


Figura 1. Representa la frecuencia de infección medida en número de pústulas por cm² a lo largo del tiempo después de la inoculación con roya del guisante con el genotipo 1, 2 y 3, siguiendo la fórmula AUDPC (área bajo la curva de infección).

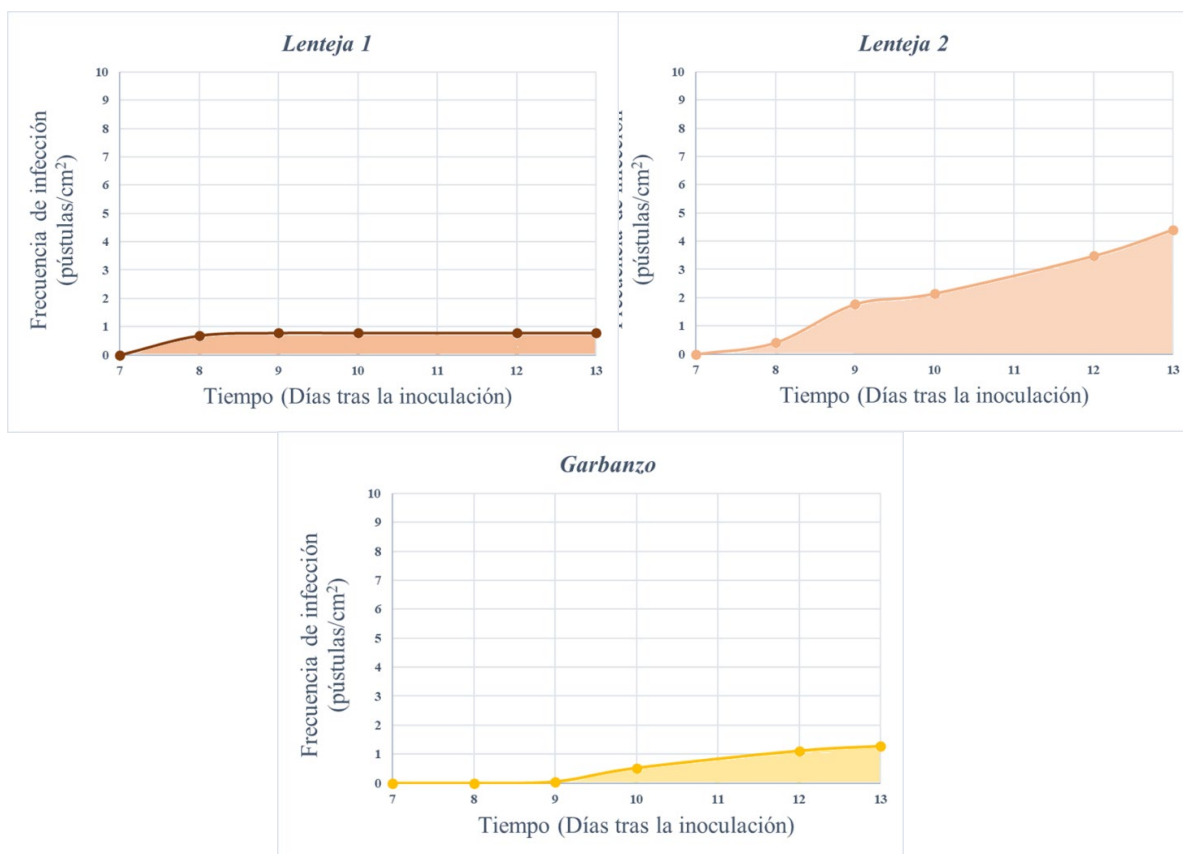


Figura 2. Representa la infección producida en los genotipos de la lenteja 1 y 2, así como del único genotipo estudiado en el garbanzo, medida según la fórmula AUDPC.

En la figura 2, observamos que en el día 13 la lenteja 1 alcanza una media de 0,77 y la lenteja 2 alcanza una media en el día 13 de 4,4. En cuanto al garbanzo, su media de infección de roya en el día 13 es de 1,27.

En este caso, la lenteja con genotipo 2 es más susceptible a la infección de roya que el genotipo 1.

	Roya ¹			Oídio ¹
	AUDPC ³	Severidad (%) ⁴	IT ⁵	IT
<i>Guisante 1</i> ²	41,03	51,25	3	2
<i>Guisante 2</i>	1,92	6,25	3	2
<i>Guisante 3</i>	10,83	21,75	3	0
<i>Lenteja 1</i>	4,15	2,25	3	0
<i>Lenteja 2</i>	12,8	5,5	2	0
<i>Garbanzo</i>	3,13	28,75	2	0

Tabla 1. Muestra los resultados obtenidos tras la inoculación con roya u oídio (¹) los distintos genotipos de guisantes, lenteja y garbanzo (²). ³ Significa Área Bajo la Curva de Infección. ⁴ Grado de severidad producido por el hongo expresado en tantos por ciento. Evaluación visual. ⁵ Tipo de infección evaluado bajo unos parámetros estándar y también evaluación de tipo visual.

En la tabla 1 podemos observar los resultados obtenidos en la evaluación conjunta de las dos enfermedades. Observamos como en general la planta guisante 3 y lentejas y garbanzo muestran menor grado de infección de oídio que las plantas guisante con genotipo 1 y 2 en cuanto al tipo de infección.

En cuanto a la roya, la planta guisante con genotipo 1 muestra también un mayor grado de afectación en todas las variables estudiadas. Además, en general se observa que las plantas estudiadas son más sensibles a la roya que al oídio.

7. CONCLUSIÓN

Las conclusiones del presente estudio son:

- Observando los resultados se puede ver que la especie más susceptible a la roya es el guisante mientras que el genotipo 2 es el guisante más resistente a ella. Lentejas y garbanzos son bastante resistentes a la roya lo cual es congruente con los resultados previos pues el hongo usado es *Uromyces pisi* que es patógeno específico de guisante y habas, siendo la lenteja 1 el genotipo más resistente.

- Comparando los diferentes resultados para determinar qué especie (guisante, lenteja y garbanzo) tiene más latencia respecto a la enfermedad vemos que se trata del garbanzo.
- Respecto a la resistencia a oídio, solamente los guisantes 1 y 2 mostraron síntomas lo cual coincide con lo esperado pues la especie de oídio utilizada (*Erysiphe pisi*) es un patógeno específico de guisante y parece que no afecta a lenteja y garbanzo. Sin embargo, hay un genotipo de guisante (guisante 3) que no muestra afectación por el hongo y por lo tanto podría contener una fuente de resistencia a oídio.
- Para conseguir la venta de estas, deberemos coger las especies con mejores características para ir cruzándolas entre ellas y así deberán salir genotipos con mejores propiedades.
- Respecto a las ventajas que podemos encontrar en estos genotipos diferentes a los que se pueden comprar en tienda, estaría la resistencia de los mismos a la roya y al oídio evitando así las pérdidas económicas y alimentarias.

8. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no se hubiera podido realizar sin la ayuda del investigador Manuel A. Jiménez Vaquero, le agradecemos su empatía al entendernos desde el primer momento y hacer de todas las visitas al centro de investigación de agricultura sostenible una experiencia confortable y de total aprendizaje, a su interés por nuestro aprendizaje y por transmitir nuevos conocimientos que desconocíamos.

Agradecer al Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) por cedernos sus magníficas instalaciones y poder disfrutarlas durante este proyecto, conocer materiales científicos que desconocíamos y enriquecer nuestros conocimientos científicos.

Agradecidos también a los centros CES Lope de Vega e IES Fidiana por ofrecernos dicha actividad y ayudarnos a construir nuestro futuro. A los profesores Marcos, Elisa y Elena por ofrecernos este maravilloso proyecto y confiar en nosotros para que salga adelante.

Gracias a nuestras familias porque siempre nos apoyan y nos ofrecen su experiencia y se encargan de hacernos mejores personas y personas de provecho día a día.

9. BIBLIOGRAFÍA

Barilli, E., Moral, A., Sillero, J. C., & Rubiales, D. (2012). Clarification on rust species potentially infecting pea (*Pisum sativum* L.) crop and host range of *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. *Crop Protection*, 37, 65-70.

Patto, V., Fernández-Aparicio, M., Moral, A., & Rubiales, D. (2007). Resistance reaction to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) in a germplasm collection of *Lathyrus cicera* from Iberian origin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(7), 1517-1521.

Sillero, J. C., Fondevilla, S., Davidson, J., Patto, M. C., Warkentin, T. D., Thomas, J., & Rubiales, D. (2006). Screening techniques and sources of resistance to rusts and mildews in grain legumes. *Euphytica*, 147(1), 255-272.