

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**UNIDAD IRAPUATO**

**Uso de compuestos naturales como activadores de '*Priming*' y su  
aplicación para el mejoramiento del cultivo de frijol:**

**La afinina como modelo de estudio.**

Tesis que presenta:

**Ing. Biotecnol. María Rico Martínez**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de:

**Biotecnología de Plantas**

Directores de Tesis:

**Dr. Raúl Álvarez Venegas**

**Dr. Jorge Molina Torres**

El presente trabajo se realizó en colaboración entre el Laboratorio de Cromatina y Epigenética del Departamento de Ingeniería Genética bajo la dirección del Dr. Raúl Álvarez Venegas y el Laboratorio de Fitobioquímica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica bajo la dirección del Dr. Jorge Molina Torres, ambos investigadores titulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato (CINVESTAV Unidad Irapuato).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato por abrirme las puertas a sus instalaciones, darme la educación de calidad y enseñarme a aprender.

Al Dr. Jorge Molina Torres, quien me aceptó en su equipo de investigación y principalmente por mostrarme que es posible entender y desglosar un fenómeno, que una pregunta se convierte en dos o más y un trabajo siempre puede ser mejor, por mostrarme lo que es amar la ciencia.

Al Dr. Raúl Álvarez Venegas, por abrirme las puertas en el laboratorio de Cromatina y Epigenética. De quien aprendí a ir más allá, atreverme a intentar. Por ser un ejemplo a seguir y de quien me llevo esa constancia y esfuerzo.

A mis asesores el Dr. Martin Heil y el Dr. Rafael Rivera Bustamante. A quienes admiro y porque siempre mostraron interés en el proyecto, su asesoría fue valiosa para la culminación del mismo.

Al M.C. Enrique Ramírez Chávez por su apoyo incondicional, humana y profesional.

A mis compañeros del Laboratorio de Fitobioquímica y del Laboratorio de Cromatina y Epigenética, por todos los buenos momentos y apoyarme durante la realización de este proyecto.

A las mujeres de mi vida: Marissa, Lala, Gaby, Ale, Evelia, Ury y Erika gracias por aceptar ser mi familia y compartir increíbles aventuras.

**Dedicatoria**

**A Dios**

**Al universo**

**A esa energía que nos mantiene en movimiento**

## CONTENIDO

ANTECEDENTES	1
a) Mecanismos de defensa	1
Constitutivos	1
Inducidos	1
b) Fitopatología	2
Biótrofos	2
Necrótrofos	2
Hemibiótrofos	2
Triangulo de enfermedad	2
c) Proceso de defensa	3
Reconocimiento del patógeno	3
Respuesta local	4
Respuesta sistémica	4
Respuesta sistémica adquirida (SAR)	7
Resistencia sistémica inducida (ISR)	8
d) <i>Priming</i>	8
Regulación genética del <i>priming</i>	9
Compuestos naturales activadores del <i>priming</i>	11
e) Alcamidas: Afinina	13
f) Frijol común	16
Pseudomonas syringae pv phaseolicola	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
Hipótesis	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
MATERIALES	20

Equipos:	20
Reactivos:	20
Material biológico:	21
MÉTODOS	22
Inducción de <i>priming</i>	22
Crecimiento de bacteria <i>Pseudomonas syringae pv. phaseolicola</i>	25
Obtención de extracto etanólico de <i>Heliopsis longipes</i>	26
Purificación de afinina	26
Soluciones de afinina y extracto	28
Análisis de UFC	28
Extracción de RNA	29
Síntesis de cDNA	30
Análisis de la expresión de genes	30
Análisis de los metabolitos involucrados en la señalización	30
Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EIMS)	31
PARTE EXPERIMENTAL	32
a) Activación de <i>priming</i> en plantas de frijol Negro Querétaro	32
b) Activación de <i>priming</i> en plantas de frijol BAT93	32
Determinación del gen <i>PvPR1</i>	33
Cuantificación de semillas por planta y por vaina	34
Cuantificación de peso seco de la parte aérea	34
c) Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas syringae pv phaseolicola</i>	34
d) Cuantificación de UFCs	35
Aplicación del activador antes del patógeno	36
Aplicación del activador después de la inoculación del patógeno	37
e) Análisis de los metabolitos involucrados en la señalización	37
Determinación de las condiciones de derivatización con BSTFA	37
Comparación entre la derivatización con BSTFA y con PFB	38

Elección del solvente para extraer los metabolitos de muestra vegetal _____	38
Determinación de JA y SA en plantas de frijol después de la aplicación de afinina _____	38
Activación con afinina y patógeno _____	39
RESULTADOS _____	41
Activación de <i>priming</i> en plantas de frijol Negro Querétaro _____	41
% de germinación _____	41
Síntomas de infección _____	41
Activación de <i>priming</i> en plantas de frijol BAT93 _____	42
% germinación _____	42
Síntomas de infección _____	43
Determinación del gen PvPR1 _____	44
Determinación de semillas _____	44
Peso seco _____	45
Cuantificación de ácido jasmónico _____	50
Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas syringae pv phaseolicola</i> _____	51
Determinación de UFC _____	52
Aplicación del activador antes del patógeno _____	52
Aplicación del activador después de la inoculación del patógeno _____	56
Determinación de los metabolitos involucrados en la señalización _____	58
Comparación entre la derivatización con BSTFA y con PFB _____	62
Detección de metabolitos en muestra derivatizada con BSTFA y PFB _____	75
Elección del solvente para extraer los metabolitos de muestra vegetal _____	76
Curva de calibración _____	80
Determinación de JA y SA en plantas de frijol con afinina _____	80
Activación con afinina _____	80
Activación con afinina y patógeno _____	82
Cuantificación de UFC _____	84
Análisis de <i>priming</i> _____	84

DISCUSIÓN	86
Frijol común variedad Negro Querétaro	86
Frijol común variedad BAT93	86
Semilla y peso seco	86
Mejor tratamiento	87
Gen PvPR1	87
Ácido jasmónico	88
Cinética de crecimiento de <i>P. syringae</i>	88
UFC	88
Determinación de AJ y AS	89
CONCLUSIONES	91
PERSPECTIVAS	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO 1. Cuantificación de semillas	100
ANEXO 2. Peso seco	116
ANEXO 3. Datos de cinética	118
ANEXO 4. Resultados de UFC	120



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ejemplos de metabolitos involucrados en la señalización de tejidos sistémicos durante la defensa de plantas (tomado de Shah y Chaturvedi, 2013).</i> .....	5
<i>Figura 2. SAR y ISR son vías de defensa consideradas antagónicas.</i> .....	7
<i>Figura 3. Proceso de priming de un gen de defensa.</i> .....	10
<i>Figura 4. Análisis de expresión de genes cuando hay priming.</i> .....	11
<i>Figura 5. El priming es un fenómeno que activa diversas vías tanto metabólicas como genéticas.</i> .....	12
<i>Figura 6. Compuestos naturales como activadores del fenómeno de priming (tomado de Aranega-Bou et al., 2014).</i> .....	13
<i>Figura 7. Estructura molecular de la a) N-acil homoserinlactona, b) N-aciletanolamina y c) de las alcaloides.</i> .....	14
<i>Figura 8. Estructura molecular de la afinina, N-isobutil-3[E],6[Z],8[E]-decatrienamida (Salgado-Garciglia et al., 2008).</i> .....	15
<i>Figura 9. Inoculación de bacteria a través de herida.</i> .....	23
<i>Figura 10. Inoculación de bacteria por infiltración.</i> .....	24
<i>Figura 11. Metodología de inducción de priming y toma de muestra.</i> .....	26
<i>Figura 12. Toma de muestra para análisis de UFC.</i> .....	29
<i>Figura 13. Aplicación de la solución de afinina y patógeno en la planta.</i> .....	34
<i>Figura 14. Robot utilizado para el estudio de las cinéticas de crecimiento.</i> .....	35
<i>Figura 15. Metodología utilizada para la determinación de UFC cuando la afinina es aplicada antes de la inoculación del patógeno.</i> .....	36
<i>Figura 16. Metodología para la determinación de UFC cuando el activador es aplicado después del patógeno.</i> .....	37
<i>Figura 17. Metodología para el análisis de metabolitos en plantas con afinina.</i> .....	39
<i>Figura 18. Metodología para el análisis de metabolitos en plantas con afinina y patógeno.</i> .....	40
<i>Figura 19. Síntomas en plantas de frijol Negro Querétaro con patógeno y afinina+patógeno.</i> .....	41
<i>Figura 20. Plantas de frijol Negro Querétaro a los 21 ddp.</i> .....	42
<i>Figura 21. Porcentaje de germinación de semillas de frijol BAT93.</i> .....	43
<i>Figura 22. Síntomas de infección 5 ddp con frijol BAT93.</i> .....	43
<i>Figura 23. Estructura del ácido salicílico, PM=138 m/z.</i> .....	58
<i>Figura 24. Estructura del SA con dos iones trimetilsilil adicionados a la molécula, PM=282.</i> .....	58
<i>Figura 25. Espectro de masas del ácido salicílico derivatizado con BSTFA.</i> .....	59
<i>Figura 26. Cromatogramas de AS derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 45 minutos (azul) de reacción.</i> .....	59
<i>Figura 27. Cromatogramas de AS derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 60 (azul) minutos de reacción.</i> .....	60

Figura 28. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 120 (azul) minutos de reacción.....	60
Figura 29. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA a 80°C (negro) y 120°C (azul). .....	61
Figura 30. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA con piridina (negro) y sin piridina (azul). .....	61
Figura 31. Cromatogramas de SA derivatizado con PFB (negro) y BSTFA (azul). .....	63
Figura 32. Espectro de masas de SA derivatizado con PFB. ....	63
Figura 33. Espectro de masas de SA derivatizado con BSTFA.....	64
Figura 34. Cromatograma JA derivatizado con PFB (azul) y BSTFA (negro). .....	65
Figura 35. Espectro de masas de JA derivatizado con BSTFA. ....	65
Figura 36. Espectro de masas de JA derivatizado con PFB. ....	66
Figura 37. Cromatograma de AA derivatizado con PFB (negro) y con BSTFA (azul). .....	67
Figura 38. Espectro de masas de ácido azelaico con BSTFA. ....	67
Figura 39. Cromatograma de AB derivatizado con PFB (negro) y BSTFA (azul).....	68
Figura 40. Espectro de masas de AB con BSTFA. ....	69
Figura 41. Espectro de masas de AB con PFB. ....	69
Figura 42. Cromatograma de AC derivatizado con BSTFA (azul) y PFB (negro).....	70
Figura 43. Espectro de masas AC derivatizado con BSTFA. ....	70
Figura 44. Espectro de masas AC derivatizado con PFB. ....	71
Figura 45. Cromatograma de D con PFB (negro) y con BSTFA(azul). ....	72
Figura 46. Espectro de masas de D derivatizada con BSTFA. ....	72
Figura 47. Cromatograma del metil jasmonato. ....	73
Figura 48. Espectro de masas de MJ.....	73
Figura 49. Espectro de masas de MS con BSTFA. ....	74
Figura 50. Espectro de masas del MS con BSTFA.....	74
Figura 51. Cromatograma de tejido vegetal derivatizado con BSTFA(azul) y PFB (negro).....	76
Figura 52. Cromatograma de extractos vegetal con AE (negro) y E (azul).....	77
Figura 53. Cromatogramas de extractos vegetales con AE (negro) y M (azul).....	77
Figura 54. Cromatograma de extracto vegetal con AE (negro) y E (azul) adicionados con 10 µL de estándar interno a 1 mg/mL.....	78
Figura 55. Cromatograma de extracto vegetal con AE (negro) y con M (azul) adicionados con 10 µL de estándar interno a 1 mg/mL.....	79
Figura 56. Curva de calibración de a) SA y b) JA. ....	80

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expresión del gen PvPR1 en plantas de frijol BAT93. ....	44
Gráfico 2. Cantidad de semillas en plantas tratadas con afinina regada ( $p < 0.05$ ). ....	46
Gráfico 3. Cantidad de semillas en plantas tratadas con afinina asperjada ( $p < 0.05$ ). ....	46
Gráfico 4. Cantidad de semillas en plantas tratadas con extracto regado ( $p < 0.05$ ). ....	47
Gráfico 5. Cantidad de semillas en plantas tratadas con extracto asperjado ( $p < 0.05$ ). ....	47
Gráfico 6. Análisis de peso seco en plantas que fueron regadas con afinina ( $p < 0.05$ ). ....	48
Gráfico 7. Análisis de peso seco en plantas que fueron asperjadas con afinina ( $p < 0.05$ ). ....	48
Gráfico 8. Análisis de peso seco en plantas que fueron regadas con extracto de <i>H. longipes</i> ( $p < 0.05$ ). ....	49
Gráfico 9. Análisis de peso seco en plantas que fueron asperjadas con extracto de <i>H. longipes</i> ( $p < 0.05$ ). ....	49
Gráfico 10. Determinación de JA en plantas que fueron regadas con afinina y extracto 600 $\mu\text{M}$ ( $p < 0.05$ ). ....	50
Gráfico 11. Cinética de crecimiento de <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> . ....	52
Gráfico 12. Análisis de UFC en frijol BAT93. ....	53
Gráfico 13. Determinación de UFC en función del activador ( $p < 0.05$ ). ....	54
Gráfico 14. Determinación de UFC en función de la concentración del activador ( $p < 0.05$ ). ....	55
Gráfico 15. Determinación de UFC en función de la forma de aplicación del activador ( $p < 0.05$ ). ....	55
Gráfico 16. Plantas tratadas con afinina asperjada a 600 $\mu\text{M}$ , evitan la proliferación de la bacteria ( $p < 0.05$ ). ....	56
Gráfico 17. Determinación de UFC en plantas tratadas con afinina asperjada 4 h ddp ( $p < 0.05$ ). ....	57
Gráfico 18. Determinación de UFC en plantas con extracto asperjado 4 h ddp ( $p < 0.05$ ). ....	57
Gráfico 19. Determinación de UFC cuando el activador es aplicado antes y después del patógeno ( $p < 0.05$ ). ....	58
Gráfico 20. Análisis de SA con SIM (267 M/Z) dda. ....	81
Gráfico 21. Análisis de JA con SIM (151 M/Z) dda. ....	81
Gráfico 22. Análisis de ácido salicílico con SIM (267 M/Z) ddp. ....	83
Gráfico 23. Análisis de ácido jasmónico con SIM (151 M/Z) ddp. ....	83
Gráfico 24. Comparación de niveles de AJ y AS en los tratamientos de P y AP. ....	84
Gráfico 25. Análisis de UFC. ....	85
Gráfico 26. Expresión del gen PvPR1 en hojas en frijol. ....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Descripción de los tratamientos con frijol Negro Querétaro.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 2. Forma de aplicación de afinina a las plantas de frijol BAT93.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 3. Tratamientos evaluados durante el experimento. ....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Forma de aplicación de afinina para la determinación de UFC. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 5. Tratamientos utilizados para la cuantificación de UFC.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 6. Tratamientos utilizados para la determinación de metabolitos.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 7. Toma de muestra después de la aplicación de afinina (dda) .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 8. Tratamientos utilizados en la determinación de metabolitos en plantas con A+P.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 9. Toma de muestra después de la aplicación del patógeno (ddp). ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 10. Descripción de los tratamientos utilizados para análisis de JA. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 11. Derivatización de estándares con BSTFA y PFB. ....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla 12. Iones que caracterizan a las moléculas AJ, AS, AA, AB, AC, D, MJ y MS derivatizadas con BSTFA.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 13. Comparación entre los extractos metanólico, etanólico y con acetato de etilo.....</i>	<i>79</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido Azelaico
<b>adp</b>	Antes de aplicar el patógeno
<b>AHLs</b>	N-acyl homoserine lactones
<b>AMDIS</b>	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
<b>BSTFA</b>	N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
<b>CDPKs</b>	Calcium Dependent Protein Kinase
<b>dda</b>	Después de aplicar el activador
<b>ddp</b>	Después de aplicar el patógeno
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>ET</b>	etileno
<b>ETI</b>	Effector-Triggered Immunity
<b>HR</b>	Hypersensitive Response
<b>ISR</b>	Induced systemic Resistance
<b>JA</b>	Jasmonic Acid
<b>MAMPs</b>	Microbe-Associated Molecular Patterns
<b>MPKs</b>	Mitogen Activated Protein Kinases
<b>MS</b>	Methyl Salicylate
<b>MS</b>	Methyl Salicylate
<b>NAEs</b>	N-acylethanolamines
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>PAMPs</b>	(Pathogen-Associated Molecular Patterns
<b>PFB</b>	2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromide
<b>PTI</b>	Pathogen Triggered Immunity
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SA</b>	Salicylic Acid
<b>SAR</b>	Systemic Acquired Resistance
<b>SAR</b>	Systemic Acquired Resistance
<b>TTSS</b>	Type Three Secretion System
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>VOCs</b>	Volatile Organic Compounds

## RESUMEN

Las plantas activan diversos sistemas de defensa cuando son sometidas a estrés biótico o abiótico. Sin embargo, el proceso de defensa supone un costo (Martinez-Medina *et al.*, 2016). Por esta razón, la evolución de algunos mecanismos de defensa ha derivado en el estado “*defense-priming*”, que consiste en un proceso de sensibilización de la planta después de un estrés para generar una respuesta más rápida y eficiente frente a futuras agresiones (Conrath, 2011). El *priming* es causado por la inducción de vías de defensa o compuestos químicos, entre ellos componentes metabólicos como el ácido salicílico (SA) y sus análogos (Frost *et al.*, 2008). La *N*-isobutil decanamida, análogo de la molécula alcanamida afinina, induce la vía de defensa y señalización del ácido jasmónico (JA) frente a patógenos necrotróficos, reduciendo el daño foliar e inhibiendo su proliferación (Méndez-Bavo *et al.*, 2011). Con lo anterior, se propone que la alcanamida afinina extraída de la planta *Heliopsis longipes* es capaz de generar el *priming* de defensa en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como memoria de la inducción de la vía de defensa del JA, inhibiendo o reduciendo los síntomas de la enfermedad del Tizón de Halo provocada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Aquí mostramos que las plantas de frijol que fueron regadas con una solución de afinina 600 $\mu$ M y posteriormente inoculadas con la bacteria, aumentaron los niveles de JA al tiempo que disminuyeron los niveles de expresión del gen *PvPR1*, pero no hubo protección contra la bacteria. En cambio, las plantas asperjadas con una solución de afinina 600 $\mu$ M presentaron un aumento en los niveles de JA y SA; cuando estas plantas fueron infectadas, disminuyó la proliferación de la bacteria (0 UFC,  $p < 0.05$ ) en el tejido foliar, en comparación con las plantas control sólo infectadas. Se observó que hay antagonismo de ambas vías (JA y SA) 4 h después de la infección. También hubo un aumento en la expresión del gen *PvPR1* de 2.6 veces ( $p < 0.05$ ) 24 h después de la infección. Los resultados anteriores muestran que las plantas tratadas con afinina cebaron el gen *PvPR1* y la bacteria *P. syringae* pv *phaseolicola* no proliferó en el tejido foliar, por lo que se sugiere que este compuesto induce el estado de *priming* en la planta.

## ABSTRACT

Plants activate various defense systems when subjected to different types of biotic or abiotic stress. However, the defense process has a cost (Martinez-Medina et al., 2016). For this reason, the evolution of some defense mechanisms has led to the "defense-priming" state, which is a process of sensitization of the plant after a stress to generate a faster and more efficient response to future attacks (Conrath, 2011). *Priming* is caused by induction of defense pathways or chemical compounds, including metabolic components like the salicylic acid (SA) and its analogs (Frost et al., 2008). The *N*-isobutyl decanamide, analog alkamide molecule affinin, induces defense pathway and signaling jasmonic acid (JA) against Necrotrophic pathogens, reducing leaf damage and inhibiting their proliferation (Mendez-Bavo et al., 2011). Then, we propose that the affinin alkamide extracted from the *Heliopsis longipes* plant is able of generating the defense-priming in common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to the induction pathway defense JA, inhibiting or reducing symptoms of disease blight caused by phytopathogenic Halo bacterium *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*. Here we show that common bean plants which were watered with a 600  $\mu$ M affinin solution and subsequently infected with phytopathogenic bacterium, increase the JA levels and decrease the *PvPR1* gene expression, but there is not protection against bacteria. Common bean plants which were sprayed with a 600  $\mu$ M affinin solution increase the JA and SA levels. Then when these plants were inoculated, they showed an inhibition on the proliferation of the bacteria (0 CFU,  $p < 0.05$ ) and an increase 2.6 n fold on *PvPR1* gene expression ( $p < 0.05$ ) compared to non-sprayed but infected plants ( $2 \times 10^6$  CFU,  $p < 0.05$ ). We observed that both JA and SA levels present antagonism 4 h after infection. The results show that plants plants which were sprayed with affinin have *priming* in the *PvPR1* gene and the *P. syringae pv phaseolicola* bacteria did not proliferate in leaf tissue, so it is suggested that this compound induces the state of *priming* in the plant.

## **ANTECEDENTES**

### ***a) Mecanismos de defensa***

Las plantas son organismos sésiles, en comparación con los animales quienes tienen la capacidad de moverse y huir de situaciones de peligro o bien, de buscar recursos (Bradshaw, 1972). Las plantas se encuentran expuestas a factores abióticos, entre los que se pueden mencionar la temperatura, humedad, salinidad, etc., y factores bióticos como los patógenos y herbívoros, que les causan estrés, disminuyen su productividad y pueden llegar a matarlas (Fraire-Velázquez y Rodríguez-Guerra, 2011). Para mitigar los daños, las plantas tienen mecanismos de defensa, por ejemplo: procesos bioquímicos, moleculares y morfológicos que les han permitido sobrevivir (Fraire-Velázquez y Rodríguez-Guerra, 2011), los cuales se han clasificado como constitutivos e inducidos:

#### **Constitutivos**

Son sistemas de defensa que se encuentran protegiendo a las plantas, independiente de un estrés actual, se les llama primeras barreras de protección y se encuentran activas aunque no haya daño o peligro (Karban y Baldwin, 1997). Podemos encontrar la protección estructural, conformada por la pared celular, quitina, suberina, cera, etc. Y por otro lado está la protección química, por ejemplo, algunas plantas producen compuestos tóxicos como terpenos o alcaloides (Henery *et al.* 2008).

#### **Inducidos**

De acuerdo a Karban y Myers (1989), se refiere a los cambios que se producen en las plantas después de haberse expuesto a un estrés. Las vías de defensa que se llevan a cabo son variadas y de diversa intensidad, de acuerdo a la especie vegetal y el tipo de estrés que promueven la respuesta. Puede haber cambios morfológicos, producción de metabolitos secundarios o proteínas de defensa (War *et al.*, 2012). Estas vías de defensa sólo se inducen cuando es necesario, lo que reduce los costos para las plantas (Kuc, 1987).

A pesar de los mecanismos de defensa que tienen las plantas, no siempre se lleva a cabo la protección total de las mismas. Cuando ocurre una infección por microorganismos o factores ambientales que les causan daño se pueden observar



síntomas como clorosis, crecimiento lento, poca productividad, entre otros. Las plantas se encuentran enfermas.

### ***b) Fitopatología***

Se considera a una planta sana cuando sus actividades fisiológicas funcionan correctamente, entre las que se pueden mencionar: división normal de las células, diferenciación, desarrollo, absorción de nutrientes, fotosíntesis, etcétera. Cuando el equilibrio se rompe debido a condiciones ambientales o por patógenos, y los procesos normales son alterados, se dice que la planta está enferma. Las enfermedades son causadas por factores ambientales o bien, por virus, macro y microorganismos (Agrios, 2005). De acuerdo a Vleeshouwers y Oliver (2014), los microorganismos que infectan a las plantas se clasifican en biótrosos, necrótrofos y hemibiótrosos, los cuales se describen a continuación:

#### **Biótrosos**

Son patógenos que crecen y obtienen sus nutrientes a partir de tejido vegetal vivo. Durante la infección, evaden o suprimen la respuesta de defensa de las plantas.

#### **Necrótrofos**

Son patógenos que crecen y obtienen sus nutrientes a partir de tejido muerto. Secretan toxinas que lisan las células del tejido infectado y toman los nutrientes de las células lisadas.

#### **Hemibiótrosos**

Son patógenos que durante las primeras etapas de infección utilizan una interacción biotrófica con las plantas para infectarlas, pero en las etapas posteriores cambian a la interacción necrotrófica.

#### **Triangulo de enfermedad**

La enfermedad se desarrolla cuando el factor ambiente, el hospedero y el patógeno tienen las condiciones óptimas para que se lleve a cabo el proceso de infección, si es así, se dice que la interacción planta-patógeno es compatible. Si hay una variación en alguno de estos factores, la colonización no se lleva a cabo, se dice entonces que la interacción fue incompatible (Francl, 2001).

### ***c) Proceso de defensa***

Cuando los mecanismos de defensa constitutivos no han bloqueado el patógeno, se generan otras respuestas que pertenecen al sistema inducido. El proceso para llevar a cabo la protección conlleva una serie de pasos moleculares, desde el reconocimiento del patógeno hasta la respuesta final de defensa.

A través del sistema inmune innato las plantas detectan e inducen las vías de señalización para la defensa contra microorganismos, la respuesta que se genera como defensa se denomina resistencia basal (Sanabria *et al.*, 2010).

#### **Reconocimiento del patógeno**

El primer paso es el reconocimiento del patógeno mediante la detección de elicitores, los cuales son moléculas que caracterizan a los microorganismos. Los elicitores pueden tener un efecto positivo o negativo durante la interacción y son reconocidos a través de diferentes vías, algunas de ellas se mencionan a continuación (Hogenhout *et al.*, 2009).

- PTI. Se refiere al reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) (Sanabria *et al.*, 2010). Los P/MAMPs son moléculas que se encuentran distribuidas en un amplio espectro de microorganismos y son reconocidas mediante receptores PRRs (Jones y Dangl, 2006). Ejemplos de P/MAMPs son: la flagelina característica de los hongos o los lipopolisacáridos, principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Zipfel y Felix, 2005).
- ETI (Sanabria *et al.*, 2010). Se denomina así porque el hospedero contiene un gen R que codifica para una proteína llamada efector de resistencia la cual detecta una molécula característica del patógeno, llamada efector de avirulencia (Sanabria *et al.*, 2010). La interacción del efector de resistencia con el efector de avirulencia lleva a la incompatibilidad entre planta-patógeno y posteriormente a la defensa, generalmente mediante la activación de la reacción hipersensitiva

(HR) (Hofius *et al.*, 2009). Cuando uno de los dos efectores, el de avirulencia o el de resistencia no se encuentra, la interacción se vuelve compatible, es decir, hay infección (Flor, 1971).

### **Respuesta local**

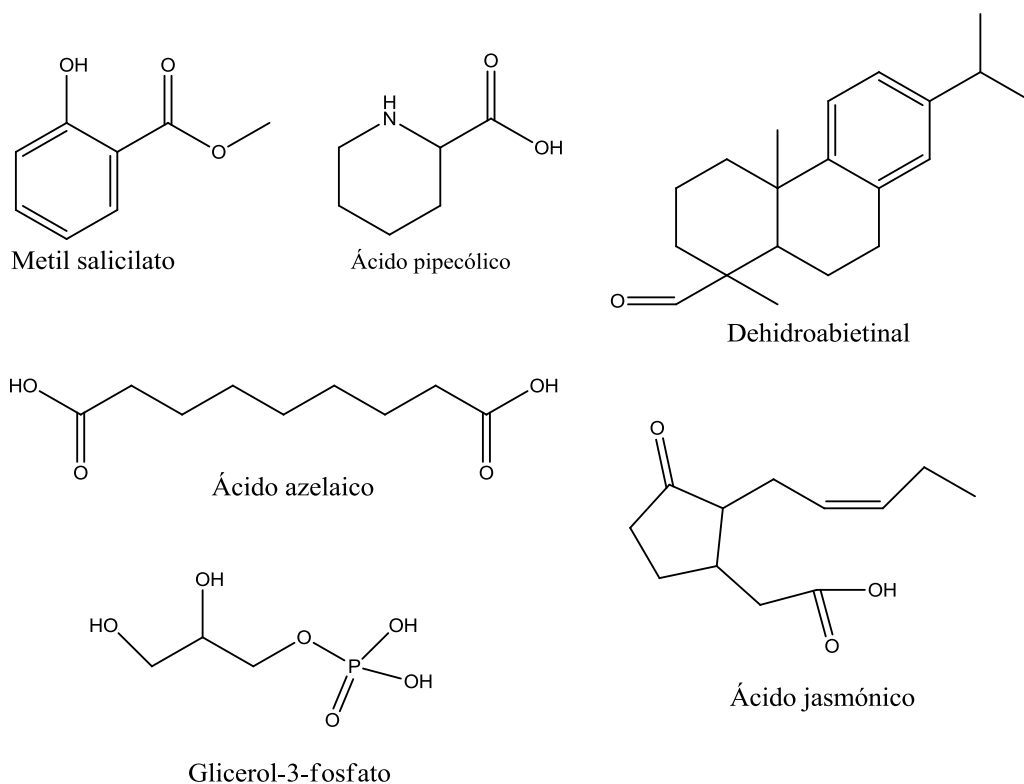
Una vez que se ha reconocido al patógeno, se induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y se elevan los niveles de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, éstos se mantienen en niveles altos mientras permanece la señalización (Kwak *et al.*, 2003). El calcio actúa como segundo mensajero activando numerosas vías de señalización como a la relacionada con las cinasas dependientes del calcio, CDPKs (Zhang *et al.*, 2014) y la cascada de señalización mediada por las MAP cinasas (MPKs) (Gao *et al.*, 2014). La presencia de iones de calcio y potasio en el espacio citoplasmático produce aumento de pH (Boller y Felix, 2009; Segonzac y Zipfiel, 2011). Las células que fueron infectadas por el patógeno y las que se encuentran alrededor del área de infección muestran un incremento en los niveles de SA y ROS (Dorey *et al.*, 1997), los cuales regulan la muerte celular programada y generan necrosis en el tejido infectado. Este fenómeno es conocido como la respuesta hipersensitiva, HR. Necrosar el tejido alrededor del área de infección evita el avance del patógeno al mismo tiempo que lo limita de agua y nutrientes (Torres *et al.*, 2005). Cabe mencionar que la HR no se encuentra en todas las plantas y no siempre detiene al patógeno (Jones y Dangl, 2006).

### **Respuesta sistémica**

En tejidos alejados del área de infección, es decir, en tejidos sistémicos, también se desencadenan mecanismos de defensa, usualmente se realiza en los tejidos más jóvenes (Kachroo y Robin, 2013). La señal para activar la respuesta sistémica viaja a través del tejido vascular hasta los tejidos alejados al área de infección. Alrededor de los años 90's, investigaciones mostraron que durante la respuesta sistémica había un incremento en la producción de SA en el floema, por lo que hizo pensar que el SA era la molécula señal. Por ejemplo, Gaffney y colaboradores en 1994, encontraron que en plantas transgénicas de tabaco incapaces de almacenar SA, no desarrollaron la respuesta sistémica. Sin embargo, recientemente se descubrió la presencia de la

enzima salicilato hidroxilasa cuya función es hidrolizar al SA y transformarlo en catecol, por lo que en la actualidad se considera que el SA no es la molécula señal (Vernooij *et al.*, 1994).

Se han descubierto otros metabolitos que participan en la señalización durante la defensa sistémica, como por ejemplo el metil salicilato (MS). Se ha propuesto la posibilidad de que el MS viaja desde el área de infección hasta los tejidos sistémicos y una vez ahí, es convertido a SA el cual desencadena la respuesta sistémica (Shah y Chaturvedi, 2013). Otros metabolitos propuestos como moléculas de señalización a nivel sistémico son el dehidroabietinal, el glicerol-3-fosfato, el ácido azelaico, el ácido piperónico y los jasmonatos (Figura 1). Éstos últimos han sido investigados ampliamente puesto que tienen una función importante en la defensa, estando asociados a la protección contra daño mecánico y patógenos necrótrofos (Shah y Chaturvedi, 2013).



**Figura 1. Ejemplos de metabolitos involucrados en la señalización de tejidos sistémicos durante la defensa de plantas (tomado de Shah y Chaturvedi, 2013).**

Tanto la respuesta a nivel local como a nivel sistémico descritas anteriormente son parte de la vía de defensa mediada por la vía del SA. Se le conoce como Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) y se ha caracterizado principalmente para la defensa contra patógenos biótropos y hemibiotropos (Sticher *et al.*,1997). Sin embargo, no es la única vía, tampoco está claro cuál ni cómo es el mecanismo de defensa, cuántos mecanismos de defensa existen, la interacción entre los metabolitos, entre los genes y entre planta-patógeno-ambiente. Hoy en día se describen dos mecanismos de respuesta sistémica:

- SAR: Respuesta Sistémica Adquirida.
- ISR: Respuesta Sistémica Inducida.

Ambas vías son sistémicas, inducidas y adquiridas, lo cual ha generado confusión, ya que su nombre no da información que las pueda diferenciar. De hecho, el término de respuesta sistémica fue reportado por primera vez en 1930 (Chester, 1930). A partir de ahí se han utilizado términos como resistencia adquirida, resistencia activada, pre-inmunidad, inmunización, sensibilización, entre otros; todos como sinónimos para la respuesta inducida (Sequeira, 1983). Sin embargo, la SAR y la ISR son mecanismos distintos y se ha considerado que son antagónicos (Shah y Chaturvedi, 2013).

Independiente del nombre que se le dio a cada vía, las definiciones actuales para cada una se muestran a continuación:

- SAR: es el mecanismo de defensa inducido a nivel sistémico, es activado para la protección contra patógenos biótropos y hemibiotropos, principalmente. Esta vía se caracteriza por ser dependiente del SA (Shah y Chaturvedi, 2013).
- ISR: es el mecanismo de defensa inducido a nivel sistémico, es activado para la protección contra patógenos necrotropos principalmente, se caracteriza por estar regulado o ser dependiente de las fitohormonas JA y etileno (ET) (Shah y Chaturvedi, 2013).

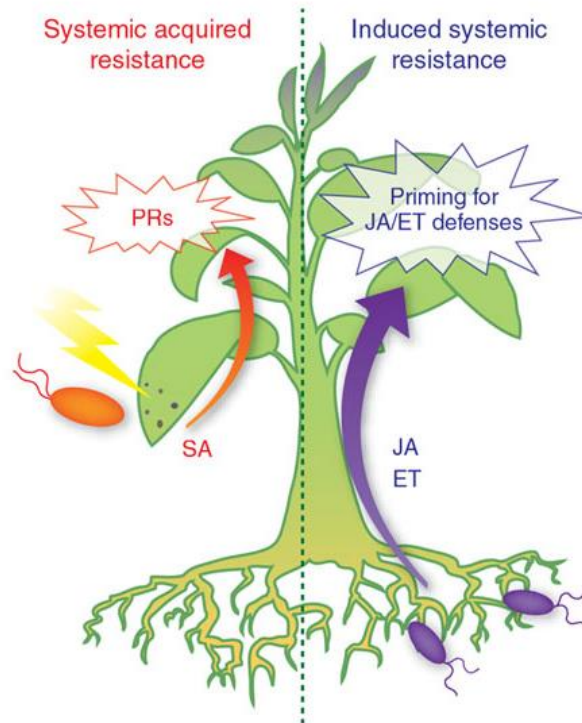


Figura 2. SAR y ISR son vías de defensa consideradas antagónicas.

Se ha propuesto que hay dos vías principales de defensa en plantas, la SAR dependiente de la fitohormona SA cuya respuesta es la expresión de genes relacionados con la patogénesis PRs; y la ISR dependiente de la fitohormona JA y/o ET activada principalmente por rizobacterias. Se considera que ambas vías son antagónicas y la defensa se realiza en tejidos sistémicos (tomado de Pieterse *et al.*, 2009).

### Respuesta sistémica adquirida (SAR)

La SAR está mediada principalmente por la fitohormona SA. Se ha observado que una mutación en genes involucrados en la biosíntesis del SA provoca la disminución en la capacidad de defensa (Durrant y Dong, 2004). Esta vía se activa como respuesta al ataque principalmente de patógenos biótrofos y hemibiótrofos (Glazebrook, 2005). Una vez que se induce protege contra un amplio espectro de microorganismos (Shah y Chaturvedi, 2013). De acuerdo a Kachroo y Robin (2013) el proceso que lleva a la SAR conlleva 3 pasos principales:

1. Reconocimiento del patógeno y generación de la señal. Este proceso se realiza en las primeras 4-6 horas.
2. Translocación de la señal.
3. Rapidez para inducir las vías de defensa en el tejido sistémico.

Las moléculas señal que viajan a través del floema, conducen a la expresión de genes relacionados con la patogenicidad PRs en el tejido sistémico, cambios estructurales en las células y producción de metabolitos (Fu y Dong, 2013). Este fenómeno también se puede inducir mediante la aplicación exógena de ácido salicílico o análogos sintéticos del mismo, como ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) o el benzotidiazol (BTH) (Lawton *et al.*, 1996).

### **Resistencia sistémica inducida (ISR)**

La ISR se activa de la misma forma que la SAR, pero este mecanismo está mediado por las fitohormonas JA y ET, principalmente protegiendo contra patógenos necrótrofos (Glazebrook, 2005). Este mecanismo se observó inicialmente en plantas que habían sido colonizadas por rizobacterias benéficas (Shah y Chaturvedi, 2013). Las plantas en las que se induce SAR tienen una expresión alta del gen *PR1*, mientras que plantas en las que se induce la ISR acumulan transcritos de genes relacionados con la vía del JA como *PDF1.1*, *PDF1.2*, etc.; aun así, hay varios elicitores de la ISR que activan el promotor de *PR1* (Choudhary *et al.*, 2007).

#### ***d) Priming***

*Defense-priming* es un término en inglés, en español no se tiene la traducción directa, se ha utilizado la palabra “cebado” como una traducción, pero no explica por completo el fenómeno de *priming*. En este trabajo se utilizará el término de *priming* para referirnos al fenómeno y “cebado” o “cebar” para referirnos a la acción involucrada en el proceso de *priming*.

La respuesta sistémica confiere una memoria de inmunidad que puede durar semanas (Fu y Dong, 2013) o meses y más recientemente se ha comprobado que puede heredarse a la siguiente generación (Luna *et al.*, 2012; Pieterse, 2012; Rasmann., 2012; Slaughter *et al.*, 2012; Walters y Paterson, 2012). La ventaja de esta memoria es que las plantas pueden responder más rápido y en mayor medida frente a una segunda infección (Conrath, 2011) mediante el aumento en la producción de proteínas, expresión de genes PR, SA (para el caso de SAR), metabolitos y expresión de genes de defensa en comparación con plantas sin SAR (Scheffer, 1997; Hammerschmidt y Kuc, 1995). Esta memoria es denominada “*Priming*” y confiere resistencia frente a un

amplio espectro de patógenos y factores abióticos que causan estrés (Corath *et al.*, 2002).

Es importante aclarar que los mecanismos de defensa inducidos en tejidos sistémicos, por sí mismos ya son un efecto de la memoria de la planta, pero es diferente a la memoria que confiere el *priming*. Las plantas que han sido inducidas, presentan niveles altos de expresión de genes y metabolitos de defensa, cambios estructurales como engrosamiento de la pared celular, etc. durante el tiempo en que la planta permanece en ese estado (Luna *et al.*, 2012). El *priming* por otro lado, es consecuencia de una inducción previa de las vías de defensa pero que posteriormente vuelven a su estado natural, es decir, sin inducción. Las plantas primadas presentan estados basales de metabolitos de defensa y la expresión de genes son semejantes a plantas no primadas. Cuando hay un segundo estrés, se activan las vías de defensa más rápido, en mayor cantidad y más eficientemente. El *priming* mantiene latentes las estrategias de defensa hasta que son necesarias (Conrath, 2011), lo que les permite a las plantas evitar gastos adicionales de defensa cuando no hay estrés (Holeski *et al.*, 2012).

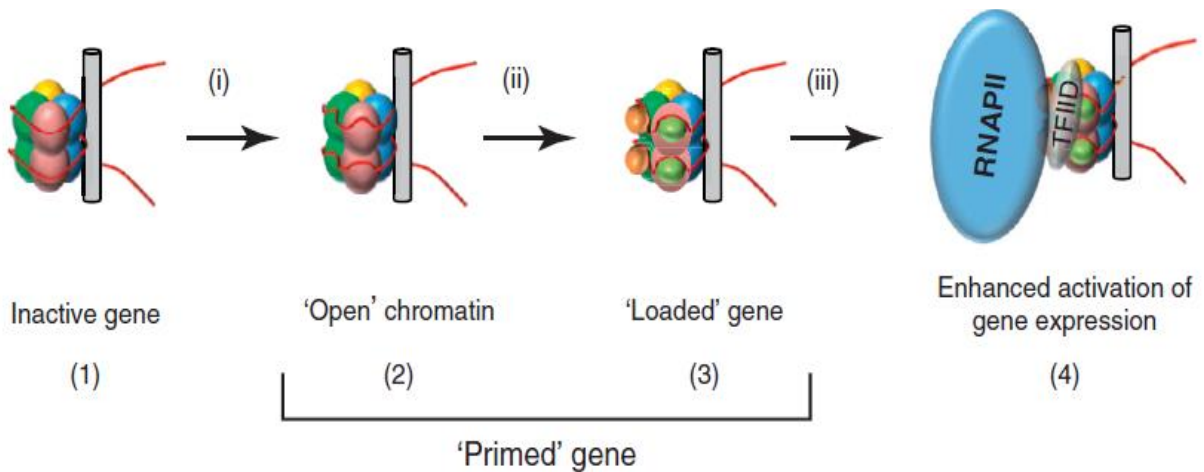
### **Regulación genética del *priming***

La información genética de los seres vivos se encuentra en el DNA. Los organismos eucariotes la empaquetan alrededor de una serie repetitiva de bloques de proteínas llamados nucleosomas. Cada bloque está compuesto principalmente por 2 copias de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4 llamadas histonas. El conjunto de histonas, DNA, RNA y proteínas no histónicas es denominado cromatina y su estado es determinado por las condiciones de fuerza iónica, concentración de iones divalentes y a las modificaciones de las histonas (Luger *et al.*, 1997). Estas últimas se refieren a las modificaciones covalentes como la metilación, acetilación, ubiquitinación, entre otras, las que juegan un papel importante en la regulación genética (Bannister y Kouzarides, 2011).

Se ha observado que la expresión de genes involucrados en el *priming* está relacionada con modificaciones en la cromatina como la metilación de histonas (Holeski *et al.*, 2012) o metilación del DNA (Hughes y Brown, 1992).



Se han propuesto diversos mecanismos para el proceso de *priming* de plantas. En la Figura 3 se explica uno de los procesos propuestos y que hasta el momento es el más aceptado: estado 1, las plantas que no se encuentran enfrentando algún tipo de estrés tienen la cromatina cerrada, impidiendo la expresión de genes de defensa; estado 2, una vez que se detecta el estrés la cromatina presenta una conformación abierta; estado 3, se llevan a cabo una serie de modificaciones epigenéticas que permiten la entrada a la maquinaria de transcripción; estado 4, para que sea posible la expresión de genes de defensa. Si este proceso se realiza cada vez que ocurre un cambio en el ambiente que produzca estrés, el costo se vuelve alto. Por lo que las plantas han desarrollado una estrategia en la cual, una vez que han pasado por un estrés y se ha generado la respuesta (estado 1, 2, 3 y 4 de la Figura 3) ya no regresan al estado inicial, sino que permanecen con las modificaciones epigenéticas mostradas en el estado 3. En este punto se dice que la planta se encuentra cebada, primada o sensibilizada, puesto que en un segundo estrés ya no requeriría el proceso de apertura y modificación de la cromatina, sino que pasarían directo a la expresión de los genes, del estado 3 al estado 4. El cebado de un gen, permite que éste sea expresado de una forma más rápida y eficiente (Conrath, 2011).



**Figura 3. Proceso de *priming* de un gen de defensa.**

A nivel molecular el fenómeno de *priming* inicia con un estímulo, el cual puede ser causado por un estrés biótico o abiótico que provoca la apertura de la cromatina, seguido de una serie de modificaciones epigenéticas como por ejemplo metilaciones de las histonas que permiten a la maquinaria de transcripción entrar y expresar los genes de defensa. El fenómeno de *priming* es un tipo de memoria, a través de este proceso las modificaciones epigenéticas

permanecen durante días, meses y hasta generaciones, lo que favorecen la respuesta de defensa frente a futuras agresiones (tomado de Conrath, 2011).

Cuando las plantas cebadas (Figura 4) se enfrentan a un segundo estrés, la expresión de genes de defensa se incrementa a niveles mayores en comparación con las plantas no cebadas (Figura 4) en las mismas condiciones de estrés (Jaskiewicz, 2011).

Las plantas en las cuales se ha activado el fenómeno de *priming* con BTH (barra 2), presentan niveles basales de expresión del gen de defensa WRKY29 semejantes a los niveles de expresión del control (barra 1). La expresión del gen aumenta cuando las plantas sin *priming* (barra 3) se enfrentan a un estrés y esta expresión se ve aumentada casi al triple en las plantas con *priming* (barra 4) que también enfrentan el mismo estrés (tomado de Jaskiewicz, 2011).

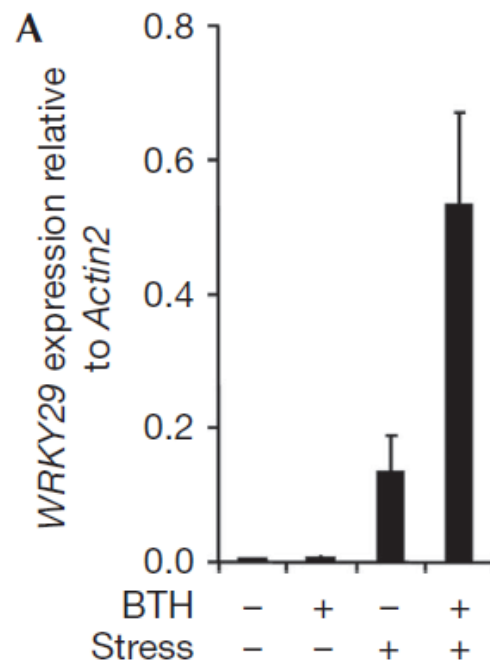


Figura 4. Análisis de expresión de genes cuando hay *priming*.

### Compuestos naturales activadores del priming

Como ya se había mencionado, es posible inducir la defensa en tejidos sistémicos mediante la aplicación exógena de compuestos sintéticos, por ejemplo, los análogos al SA como INA y BTH los cuales llevan a un estado de *priming* (Corath *et al.*, 2002). En plantas primadas la respuesta de defensa depende del estrés al cual sean sometidas en un segundo estrés y las vías tanto de señalización como metabólicas son tan variadas que van desde vías dependientes de SA, JA, MAPK, ET/JA, ROS, PR, PTI, ETI, volátiles, lípidos, etc. hasta modificaciones estructurales en la pared celular como

engrosamiento con callosa, etc. Como se puede observar en la Figura 5 (Balmer *et al.*, 2015).

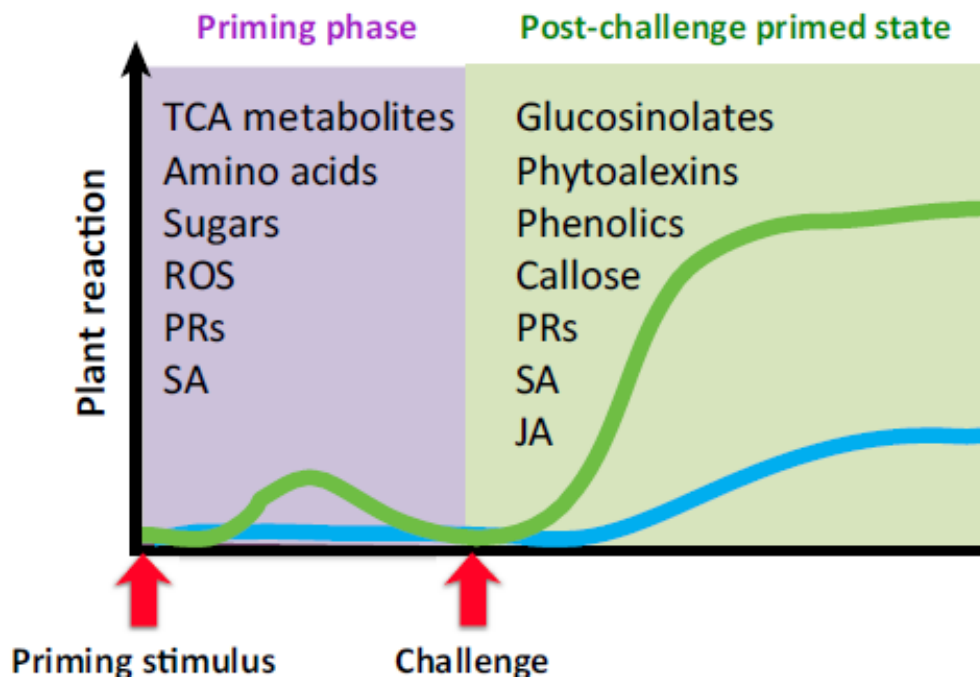


Figura 5. El *priming* es un fenómeno que activa diversas vías tanto metabólicas como genéticas.

El primer estímulo para la activación del fenómeno de *priming* conlleva a la producción de metabolitos como azúcares, ROS, etc., y la expresión de genes de defensa como los relacionados a la patogenicidad PRs. Cuando la planta se enfrenta a un posterior estrés como por ejemplo un patógeno, ocurre una mayor producción de metabolitos relacionados a la defensa, deposición de callosa, SA o JA; y la expresión de PRs, que en el primer estímulo (tomado de Balmer *et al.*, 2015).

La posibilidad de inducir *priming* mediante compuestos químicos sintéticos permite mejorar la defensa de las plantas de interés económico aún antes de que ocurra la infección o daño, evitando pérdidas en la producción. El uso de compuestos naturales como fungicidas o bactericidas para controlar fitopatologías se ha utilizado desde la antigüedad. Hoy en día se investiga la posibilidad de volver a utilizar compuestos naturales, pero en esta ocasión como activadores del *priming*, algunos ya se han estudiado, entre los que se pueden mencionar: vitaminas, quitosanos, volátiles, ácido azelaico, ácido piperico y ácido hexanoico. Las estructuras de los compuestos mencionados con anterioridad se muestran en la Figura 6 (Aranega-Bou *et al.*, 2014). Un grupo de compuestos provenientes de diferentes especies vegetales en especial la

especie *Heliopsis longipes* S.F. Blake una planta silvestre endémica a la Sierra Gorda en México, han mostrado tener propiedades bactericidas y fungicidas. Estas son estructuras de bajo peso molecular denominadas alcanidas, que además y más recientemente se ha demostrado que inducen la respuesta de defensa por medio de la vía del JA (Méndez-Bravo *et al.*, 2011).

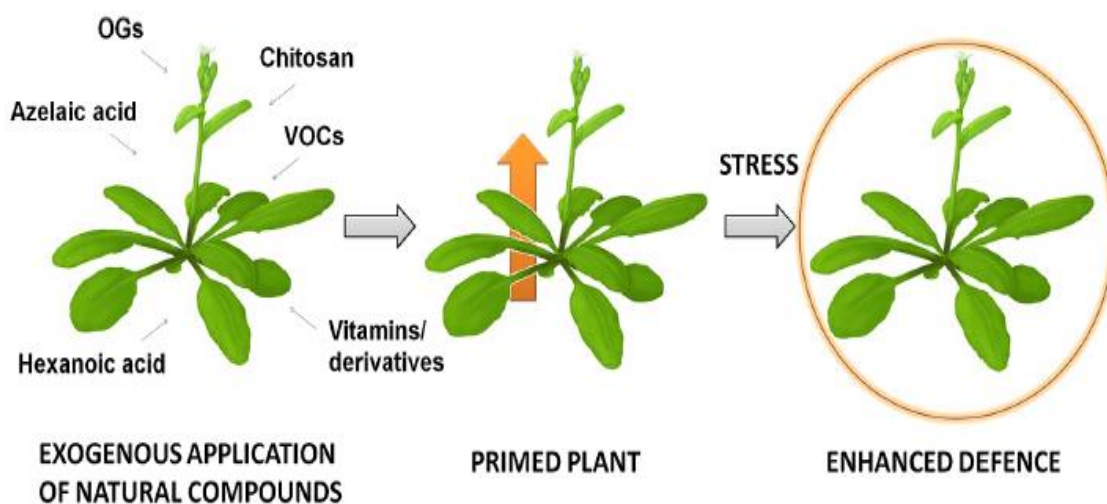


Figura 6. Compuestos naturales como activadores del fenómeno de *priming* (tomado de Aranega-Bou *et al.*, 2014).

### e) Alcanidas: *Afinina*

Las alcanidas son compuestos naturales sintetizados en plantas. Aunque se han citado en al menos 8 familias de plantas, con un total de aproximadamente 200 moléculas diferentes (Ríos, 2012), sólo aquellas estructuras alfa insaturadas en la cadena ácido son consideradas alcanidas, en sentido estricto. Se caracterizan por tener una cadena acilo y un grupo amido. Presentan una insaturación en posición alfa al grupo carbonilo y debido a esto presentan una gran variedad de actividades biológicas como: bactericida, fungicida, insecticida, diurética, anestésica, canaboimimética e inmunomoduladora (Molina-Torres *et al.*, 2004). No es de sorprender la enorme cantidad de funciones que pueden llegar a ofrecer puesto que su

estructura es muy similar a las *N*-aciletanolaminas (NAEs) que actúan como señales intercelulares y están presentes en los mamíferos (Woelkart y Bauer, 2007), o bien, semejantes a las *N*-acil-*L*-homoserin lactonas (AHLs) moléculas características de las bacterias Gram-negativas (Ríos, 2012) y participan en la comunicación inter e intra celular en plantas. En la Figura 7 se muestran las estructuras moleculares de las *N*-acil homoserinlactonas, *N*-aciletanolaminas y de las alcanidas, en color rojo se resalta la parte de la molécula que es semejante en los 3 tipos de estructuras (Méndez-Bavo *et al.*, 2011).

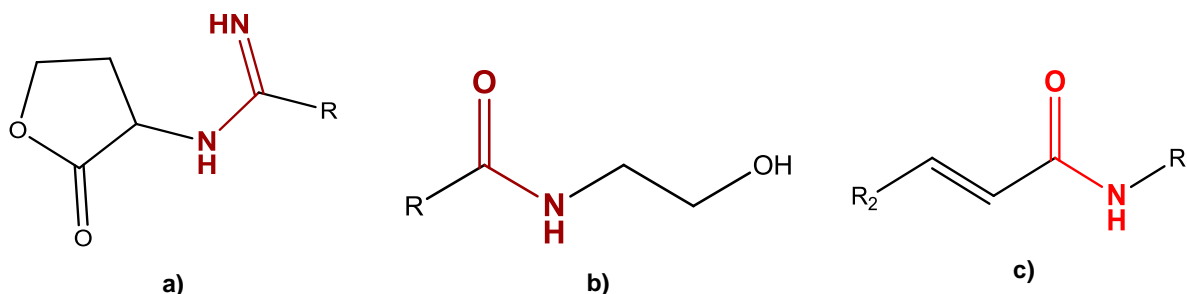


Figura 7. Estructura molecular de la a) *N*-acil homoserinlactona, b) *N*-aciletanolamina y c) de las alcanidas.

Las plantas que contienen alcanidas se han utilizado ampliamente en la medicina tradicional mexicana, china, japonesa e india ente otras. En México, las alcanidas se obtienen a partir de plantas silvestres como *Heliopsis longipes* (González-Morales *et al.*, 2011). *H. longipes* se encuentra en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí. Es conocida en dialectos mexicanos como Chilcuague, Chilcuan, Chilmecatl y Chilicuau. Otros nombres que se le atribuyen son raíz azteca, o raíz de oro (Molina-Torres y García-Chávez, 2001). Los extractos etanólicos de la raíz de esta planta han presentado propiedades anestésicas, desparasitantes, fungicidas e insecticidas. Tienen actividad bactericida contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (González-Morales *et al.*, 2011). Inhiben también el crecimiento y la germinación de esporas del hongo *Colletotricum lindemuthianum*, efecto atribuido a la afinina y al decatrien bornilo, ambas alcanidas presentes en el extracto de *H. longipes* (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008).

La afinina (*N*-isobutil-3[*E*],6[*Z*],8[*E*]-decatrienamida) se muestra en la Figura 8 y es la alcanamida mayoritaria de las raíces de *H. longipes* (González-Morales *et al.*, 2011), presenta inhibición *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* a concentraciones de 600 y 1200  $\mu\text{M}$ , la dosis letal fue de 348  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (González-Morales *et al.*, 2011).

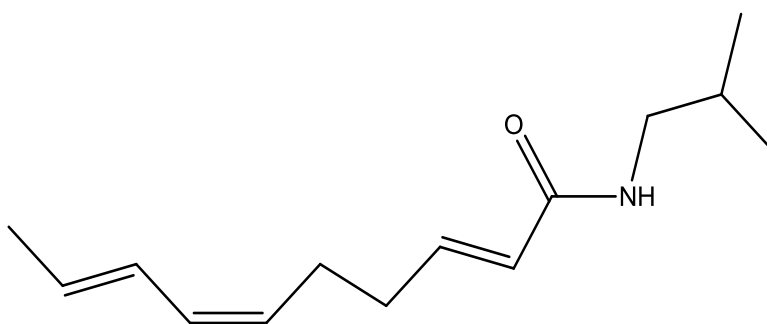


Figura 8. Estructura molecular de la afinina, *N*-isobutil-3[*E*],6[*Z*],8[*E*]-decatrienamida (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008).

En 2011 Méndez-Bravo y colaboradores aplicaron de forma exógena la forma reducida de la afinina, es decir la *N*-isobutil decanamida a plántulas *Arabidopsis thaliana*, todo en condiciones *in vitro*. Encontraron que los genes relacionados con la defensa e interacción con el medio ambiente estaban sobreexpresados, entre ellos 75 genes relacionados con la respuesta a estrés mediado a través de hormonas (auxinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico) principalmente mediante ácido jasmónico. Y por lo menos 70 genes del grupo “oxygen and radical detoxification” así como genes relacionados con la patogenicidad (PRs) se encontraron sobreexpresados. Resulta interesante que la expresión del gen *PR1*, que se ha utilizado como marcador de la vía de defensa por SA, se encontrara sobreexpresado 7.5 veces, mientras que los genes que codifican para enzimas que sintetizan SA no lo estaban. El tratamiento con *N*-isobutil decanamida evitó que el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* provocara lesiones sobre la hoja, disminuyendo el daño hasta un 90% en comparación con aquellas no

tratadas con esta alcalamida. *In vitro*, la *N*-isobutil decanamida inhibió el crecimiento del micelio hasta 15%. Algunas plantas con mutaciones en genes de la vía del JA en los genes *coi1*, *jar1* y *mpk6* (MAP kinasa) fueron incapaces de defenderse contra el hongo, a pesar de aplicarle la *N*-isobutil decanamida, a diferencia de las plantas con mutantes en los genes de la vía de SA *eds16/sid2-1* (Méndez-Bavo *et al.*, 2011).

#### **f) Frijol común**

El frijol común o *Phaseolus vulgaris* L. es una planta rastrera trepadora nativa de Mesoamérica. Pertenece a la familia *Fabaceae* y se considera la leguminosa más importante del mundo debido a sus características nutricionales (Muñoz-Saldaña, 2010). Se cultiva en los 5 continentes debido a su capacidad de crecer en diversos climas y en un amplio rango de altitud, desde 50 hasta 2300 metros sobre el nivel del mar, por lo tanto, no es rara la gran diversidad en color, tamaño y sabor de las semillas, así como de las características de desarrollo y defensa de las plantas (Jones, 1999). En algunas regiones de México es la principal fuente de proteína y junto al maíz conforman la alimentación base, razón por la cual se ha convertido en el segundo cultivo más importante del país (Muñoz-Saldaña, 2010).

La producción de frijol se ve disminuida por la presencia de patógenos y herbívoros, de éstos últimos nos encontramos con gorgojos (*Zabrotes subfasciatus*), gusanos, etc. (Jones, 1999). Por otro lado, los patógenos que causan enfermedades son los virus, hongos como *Colletotricum lindemuthianum* causante de la antracnosis y bacterias como *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* causante del Tizón de Halo (DGIEA-MAG, 1991).

#### ***Pseudomonas syringae pv phaseolicola***

*Pseudomonas syringae pv phaseolicola* es una bacteria móvil Gram-negativa, pertenece a la familia *Pseudomonaceae* y mide de entre 0.7-1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Arnold *et al.*, 2011). Es un fitopatógeno causante de la enfermedad Tizón de Halo en el frijol común, uno de los 4 patógenos principales en México y causante de pérdidas entre el 15-30 % de la producción. Se desarrolla a una temperatura de 25-30 °C, con una humedad relativa alta de 80-90%. Provoca manchas en las hojas con el centro necrótico y un halo clorótico alrededor que va aumentando conforme continua la

enfermedad. En semillas infectadas se presentan manchas rojizas, las semillas no se desarrollan correctamente y se observan pequeñas y arrugadas. En plantas jóvenes y plantas con altas concentraciones de la bacteria, ocurre defoliación y hasta la muerte. La infección ocurre en zonas con clima templado y periodo de lluvia abundantes (Prudencio-Sains *et al.*, 2008).

La bacteria utiliza el sistema de secreción tipo III TTSS (Type Three Secretion System), este es un sistema proteínico semejante a una jeringa que permite a las bacterias Gram-negativas inyectar al organismo hospedero alrededor de 15-30 efectores cuya función es mimetizar la acción de compuestos internos de las células del hospedero y/o suprimir la PTI (Jones y Dangl, 2006).



## JUSTIFICACIÓN

La agricultura ha existido desde que el ser humano se volvió sedentario, estableciéndose en un lugar específico. Desde ese momento, buscó las mejores condiciones y estrategias para aumentar la producción de alimento. Mediante la observación encontró y acumuló datos sobre las fechas para cultivar y como evitar las infecciones en sus campos. Con el establecimiento de la ingeniería genética, microbiología y las herramientas de análisis químicos, la investigación en la defensa de plantas y mejoramiento de cultivos ha permitido obtener mejores cosechas. Sin embargo, y a pesar de la ardua investigación realizada, aún no se conocen con exactitud los procesos genéticos y metabólicos, la interacción con el ambiente y entes biológicos que participan en la defensa de plantas y desarrollo de las mismas. Hoy en día, no sólo se busca que las estrategias utilizadas acaben con problemas como las enfermedades en plantas, sino que la solución a estos problemas no genere otros problemas en el ambiente. Es por ello que entender los procesos y mecanismos que las propias plantas utilizan para defenderse, es aumentar nuestro conocimiento básico sobre el tema y la posibilidad de obtener una aplicación directa en los cultivos. Utilizar las herramientas que las mismas plantas poseen involucra que se estudie a fondo desde diferentes perspectivas, desde los procesos genéticos que posteriormente darán origen a entes químicos que a su vez serán el lenguaje utilizado entre los organismos y el medio ambiente. Es por eso que, en este trabajo, el interés primordial es entender el fenómeno de defensa utilizando técnicas de análisis metabólico, genético y microbiológico. Aunque, no nos darán todas las respuestas a nuestras preguntas, nos acercarán al entendimiento de la defensa en plantas.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### ***g) Hipótesis***

La alcamida afinina presenta propiedades antimicrobianas y activa la respuesta sistémica adquirida contra patógenos, por lo tanto, se propone que la afinina puede ser empleada como un activador del *priming* en *Phaseolus vulgaris* contra la bacteria *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*.

### ***h) Objetivo general***

Determinar si la afinina activa el *priming* en *Phaseolus vulgaris* L. y disminuye o bloquea el daño producido por *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*.

### ***i) Objetivos específicos***

1. Evaluar la actividad bactericida de afinina frente a *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*.
2. Determinar si la afinina funciona como activador del *priming* contra la infección de *P. syringae* L. en plantas de frijol.
3. Determinar si algunos de los metabolitos de defensa se encuentran diferencialmente producidos durante la infección por *P. syringae* en plantas de frijol tratadas con afinina en comparación con plantas control.

## **MATERIALES**

### ***j) Equipos:***

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas con impacto electrónico. GC-EIMS. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies 5975) con ionización por impacto electrónico equipado con una columna capilar 122-0162UI DB-1ms Ultra Inert (60m x 320 $\mu$ m x 20  $\mu$ m). Los cromatogramas y espectros de masas se analizaron con el Software MassHunter de Agilent Technologies. Para la evaluación de los espectros de cada componente se utilizó el Software de deconvolución automatizada de espectros de masas e identificación del NIST: AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System), herramienta que permite extraer los iones asociados a un componente y compararlos con la base de datos de espectros de masas NIST (National Institute of Standards and Technology) versión 2011.

Los demás equipos utilizados durante la investigación se mencionan a continuación.

- Centrífuga: marca Eppendorf, modelo 5415C.
- Rotavapor: marca Büchi, modelo RE11.
- Bomba de vacío: marca Büchi I, modelo V-850.
- Balanza analítica: marca Ohaus, modelo Adventurer
- Centrífuga Sorvall con rotor JA-17.
- Step One Real-Time PCR System, marca Applied Biosystems.

### ***k) Reactivos:***

- Los solventes utilizados fueron de la marca Karal y los reactivos sólidos de la marca KEM.
- Trizol, 5X First Strand Buffer, SuperScript III Reverse Transcriptase, de la marca Invitrogen.
- Oligo dT de Life Technologies.
- SYBR Green/ROX Master Mix (2X) de Thermo Scientific.
- Fertilizante de la marca Ferviafol.

- Extracto crudo de *H. longipes* L donado por el Laboratorio de FitoBioquímica de CINVESTAV Unidad Irapuato.

***l) Material biológico:***

- Se utilizó frijol común de las variedades Negro Querétaro y BAT93.
- Bacteria *Pseudomonas syringae* pv *phaseolícola* NPS3121, donada por CINVESTAV Unidad Irapuato.

## MÉTODOS

### *m)Inducción de priming*

- Acondicionamiento de invernadero o cuarto de crecimiento.

Se utilizaron macetas de 2.33 L de capacidad. Las macetas se colocaron sobre un plástico para evitar que la bacteria se filtrara al suelo o al estante.

- Día 0: Germinación de semillas.

Se lavó una bandeja de plástico con agua y jabón y se secó con toallas de papel. Al fondo de la bandeja se colocaron de 2-3 capas de toallas de papel y se asperjaron con agua destilada hasta humedecer por completo. Las bandejas y trozos de papel aluminio se colocaron en la campana de flujo laminar, se encendió el flujo y la luz UV por 10 minutos. La campana se tapó con al menos una cartulina negra. Las semillas de frijol fueron colocadas en una solución de cloro comercial al 10% y se dejaron por 3 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada 3-5 veces. Las semillas fueron colocadas sobre las toallas al fondo de la bandeja y se humedecieron nuevamente con agua destilada estéril. Las bandejas se taparon con papel aluminio y se llevaron a 28°C por 2-4 días. Una vez que las semillas germinaron, se cuantificó el porcentaje de germinación:

$$\%_{germinación} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total de semillas}} \times 100$$

- Día 3: Trasplante de las semillas germinadas.

Una vez que las semillas germinaron, se colocaron cada una en una maceta y se regaron con una frecuencia de 1-3 días.

- Día 10: Aplicación de solución de afinina.

La aplicación se realizó de forma asperjada o regada.

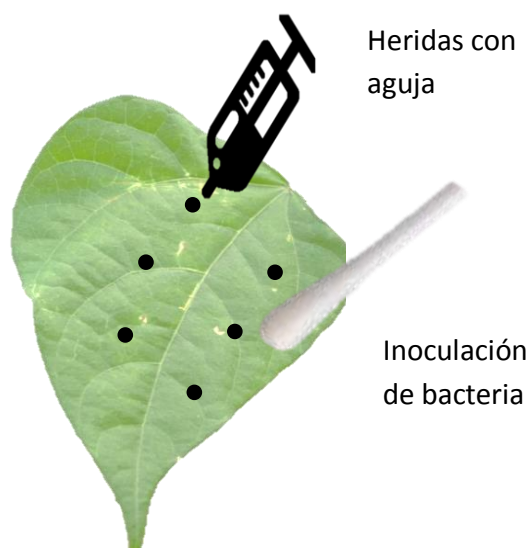
Forma regada: se aplicó 100 mL de solución de afinina al pie de la planta.

Forma asperjada: se aplicaron 7 aspersiones, 1 mL en total, de la solución de afinina sobre el primer trifolio. A los 10 días las plantas ya tenían las dos hojas verdaderas y el primer trifolio se encuentra pequeño, la aplicación de la afinina se distribuyó en todas las hojas.

- Día 17: Infección con bacteria.

Al día 17 las plantas ya tenían el segundo trifolio desarrollado.

Infección por herida: se tomaron dos hojas del segundo trifolio y perforaron con una aguja 6 veces en cada una (figura 9).



**Figura 9. Inoculación de bacteria a través de herida.**

Se humedeció un hisopo con la suspensión de bacterias (*Pseudomonas syringae pv phaseolicola* suspendidas en cloruro de magnesio o sulfato de magnesio 10 mM) y se impregnó cada herida con la suspensión. La suspensión contenía Silwutt L77 al 0.025% para evitar que las bacterias resbalaran de la hoja. Se tapó el trifolio o la planta completa con una bolsa por 24 horas, para permitir que el contenido de humedad se elevara y la infección se llevara a cabo.

Infección por infiltración: se le quitó la aguja a una jeringa de 3 mL y se tomó de la suspensión de bacteria (*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* suspendida en sulfato de magnesio o cloruro de magnesio 10 mM). Para inocular la bacteria, se colocó el dedo medio en el haz de la hoja (parte superior de la hoja) y se presionó ligeramente la jeringa en el envés (lado inferior de la hoja) para introducir la suspensión dentro de la hoja por presión. Cuando la suspensión de bacterias entró, se formó una mancha verde oscura. Se repitió el paso anterior hasta tener 6 puntos de infección en cada hoja (Figura 10). Se infectaron 2 hojas del segundo trifolio. Se tapó el trifolio o la planta completa con una bolsa de plástico durante 24 h para permitir la infección.



**Figura 10. Inoculación de bacteria por infiltración.**

- Cuidado de plantas:

Se colocaron palillos de madera para que las ramas de las plantas pudieran trepar. Se fertilizaron cada semana las plantas regando cada una con 100 mL de solución de fertilizante FERVIOL (Composición: N=20%, P=30%, K=10%), a una concentración de 5 g/L.

- Toma de muestra:

La toma de muestra se realizó 24 horas antes de la aplicación de afinina y 24 horas después de la misma, 24 horas antes de la inoculación de la bacteria y 24 horas después de la misma, y finalmente 5 días después de la inoculación de la bacteria (Figura 11).

- Colecta de semilla

Cuando las vainas de las plantas de frijol se encontraron secas, a los 4 meses de edad, aproximadamente, se cortaron con cuidado, se contabilizaron las vainas y el número de semillas de cada una.

- Fumigación de plantas contra ácaros

Se prepararon 250 mL de aceite vegetal de semilla de soya a una concentración de 2.5 % (v/v) y Abamectina a una concentración de 100 mL/100 L (1 mL/L). Las plantas fueron asperjadas con esta solución en plantas con ácaros.

#### ***n) Crecimiento de bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola****

Por cada 250 mL de medio KB se adicionó 250  $\mu$ L del antibiótico Rifampicina a una concentración de 100 mg/mL para tener una concentración final de 0.1 mg/mL y 12.5 mL de sulfato de magnesio heptahidratado a una concentración de 1 M para tener una concentración final de 10 mM.



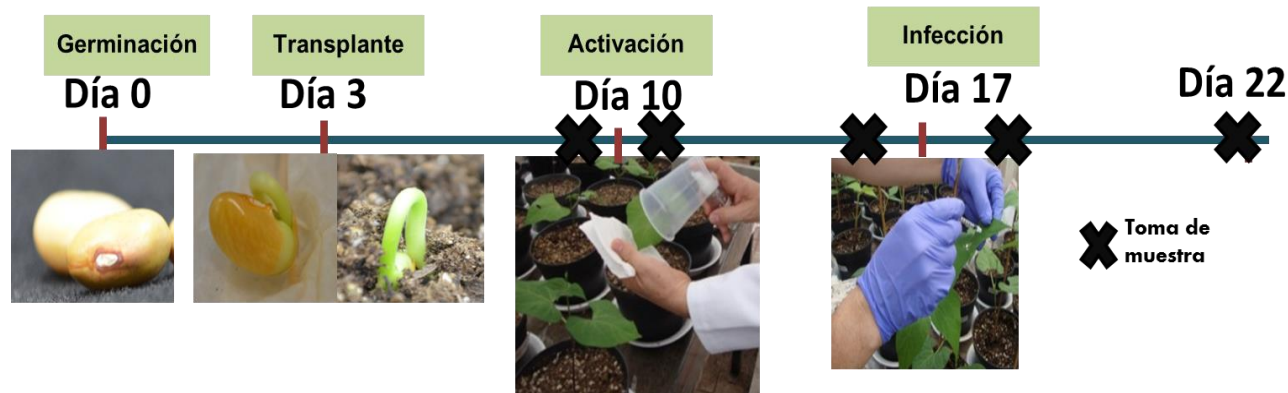


Figura 11. Metodología de inducción de *priming* y toma de muestra.

Se prepararon placas Petri con 20-30 mL cada una con medio KB sólido. Se raspó un poco del stock de *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* y se estrió en una placa, se almacenó a 28°C por 2-3 días en oscuridad. La resiembra de la bacteria se realizó cada 2-3 días. A partir del cultivo de la bacteria en caja Petri, se tomaron 1-3 colonias de *Pseudomonas syringae* y se colocó en 5 mL de medio KB con sulfato de magnesio y rifampicina, se incubó a 28°C por 24 h en oscuridad y con agitación a 200 rpm. Se vaciaron los 5 mL en 250 mL de medio KB con sulfato de magnesio y rifampicina y se incubaron a 28°C por 24 h en oscuridad y con agitación a 250 rpm. Pasadas las 24 h se midió la DO del cultivo a 600 nm, la cual siempre debe ser  $DO > 0.4$ . Utilizar como blanco el medio KB con sulfato de magnesio y rifampicina. Se centrifugó el cultivo a 4,500 rpm por 5 minutos, y se recuperó la pastilla y se resuspendió en cloruro de magnesio o sulfato de magnesio 10 Mm, de forma que la densidad óptica sea  $DO > 0.4$ , esta es la suspensión de bacterias que se inoculó en las plantas con  $DO = 0.8$ .

#### **o) Obtención de extracto etanólico de *Heliopsis longipes***

Se molieron 100 g de raíz de *Heliopsis longipes* y se añadió etanol hasta cubrir por completo, se dejó extraer a 4°C por al menos 24 horas en oscuridad. Se filtró y se eliminó el residuo sólido, el líquido obtenido es el extracto etanólico crudo.

#### **p) Purificación de afinina**

Método 1: Por cromatografía en placa fina.

Placas de TLC preparativas. Se pesaron 40 g de gel de sílice en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 90 mL de agua al matraz, inmediatamente fue tapado el matraz con Parafilm y se agitó rápidamente por 60 segundos. Se vació esta mezcla sobre el equipo dispersor para TLC calibrado a 0.5 mm para extender sobre las placas de vidrio de 20x20 cm libres de jabón y grasa, fueron utilizados guantes y toallas de papel. Cada placa se colocó sobre el Vortex para unificar la capa de gel de sílice sobre el vidrio, una vez que la capa de sílice estuvo uniforme, fueron colocadas en el horno a 60-100 °C en forma vertical por al menos 2 horas. Esto permitió que el agua se evaporara y se activara la sílice. Finalmente se almacenó en un recipiente sin humedad hasta su uso.

Desarrollo de placas. Se colocaron 2 mL de extracto diluido 1:10 de *Heliopsis longipes* en una banda continua a todo lo largo de la placa separada 2 cm del extremo y dejando sobre 1 cm de cada margen de la placa. Se prepararon 90 mL de una solución de hexano: acetato de etilo en proporción 2:1 y se adicionó a una cámara de desarrollo. Se colocó en la cámara la placa con el extracto y se dejó desarrollar por aproximadamente 1 h. Un lado vertical de la placa fue sumergido en solución de fluoresceína (0.02%) por 3 segundos, se dejó secar y se observó la placa bajo luz UV de 254 y 366 nm de longitud. La retención relativa de la afinina fue de 0.5, se observó cómo banda oscura a 254 nm. Se señaló el perímetro de la banda con una aguja y se raspó, excepto la parte que fue sumergida en la solución de fluoresceína. Se resuspendió el gel de sílice correspondiente a la banda de afinina y se dejó extraer por al menos 2 horas en oscuridad a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se evaporó a 44°C y 77 mbar de presión, la afinina es un residuo aceitoso, pesar el aceite.

#### Método 2: Purificación por columna abierta

Se llenó con hexano una columna de aproximadamente 40 cm de longitud y se adicionó con cuidado un flujo constante de gel de sílice suspendida en hexano al mismo tiempo que un flujo de hexano fue saliendo en la parte inferior de la columna, así hasta tener una altura de 36 cm de sílice empaquetada siempre embebida en hexano. Se colocó en la parte superior 2 mL de extracto etanólico de *Heliopsis longipes* y se fueron adicionando las siguientes mezclas de solventes:

- 100 mL de hexano: acetato de etilo 90:10.
- 100 mL de hexano: acetato de etilo 80:20.
- 100 mL de hexano: acetato de etilo 70:30.
- 100 mL de hexano: acetato de etilo 60:40.
- 100 mL de hexano: acetato de etilo 50:50.
- 300 mL de acetato de etilo.

En la parte inferior fueron recuperadas fracciones de 50 mL. Se evaporaron cada una de las fracciones a 40°C al vacío para eliminar el solvente, el sólido que quedó como residuo se resuspendió con 1-5 mL de etanol para ser inyectadas en el GC-EIMS.

#### ***q) Soluciones de afinina y extracto***

Se cuantificó la concentración de afinina tanto de la afinina purificada como en el extracto etanólico crudo mediante GC-EIMS. Se prepararon soluciones de afinina y extracto crudo a 600, 200 y 60  $\mu M$  respecto a la afinina, en etanol al 10%, estas soluciones fueron almacenadas en oscuridad a 4°C.

#### ***r) Análisis de UFC***

Del segundo trifolio (el trifolio infectado), se tomó un área de 1 cm<sup>2</sup>, adyacente al área que fue infectada. Se enjuagó con agua corriente y se desinfectó con una solución de cloro comercial al 1% en agua destilada estéril y se dejó por 3 minutos. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril para macerarlo con un pistilo de plástico. Se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 del trozo de hoja macerado, tomar 60  $\mu L$  de la dilución 1:1000 y se distribuyó sobre una caja Petri con medio KB, sulfato de magnesio y rifampicina. Se incubó a 28°C por 3-7 días.

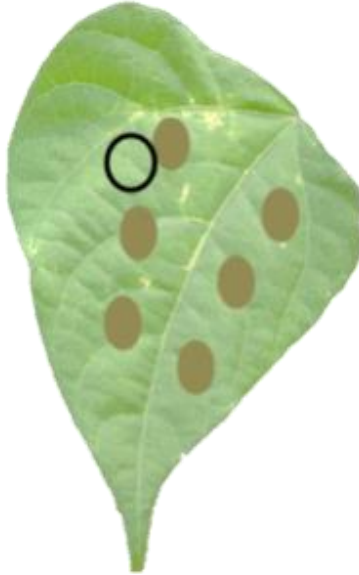


Figura 12. Toma de muestra para análisis de UFC.

### **s) Extracción de RNA**

Se molieron 50-100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido. Se colocó el material molido en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 mL de trizol, se incubó por 5 minutos a 15-30°C, posteriormente se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por mL de Trizol y se agitaron vigorosamente por 15 segundos. Se encubaron por 2-3 minutos a 15-30°C. Se centrifugó a 12,000 xg por 15 minutos a 8°C, recuperar la fase acuosa (Parte superior, líquido rojizo) y transferirla a un nuevo tubo donde se le adiciona 0.5 mL de alcohol isopropílico, se agitó suavemente y se incubó por 10 minutos a 15-30°C. Se centrifugó a 12,000 xg durante 10 minutos a 8°C, se eliminó el sobrenadante y resuspendió la pastilla en 1 mL de etanol al 75%. Centrifugar nuevamente a 7,500 xg durante 5 minutos a 2-8°C, se eliminó el sobrenadante y secó la pastilla durante 15 minutos. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 30  $\mu$ L de agua DEPC, se incubó durante 10 minutos a 55-60 °C y se almacenó a -70°C. Se analizó la integridad del RNA mediante la separación en un gel de agarosa 1.2% con 1  $\mu$ L gelred por cada 100 mL de agar al 1.2%, se utilizaron muestras de RNA de 2  $\mu$ L a 500 ng/ $\mu$ L. Se corrió el gel por 30 minutos a 60-70 volts durante 20-30 minutos.

### **t) Síntesis de cDNA**

Se realizó la siguiente mezcla: 1  $\mu\text{L}$  de oligo(dT) a 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM) y 4  $\mu\text{L}$  de RNAtotal (2000 ng totales, 500 ng/ $\mu\text{L}$ ). Se calentó a 65°C por 5 minutos, posteriormente se colocó en hielo por 1-2 minutos y se dió un pulso de centrifuga. Se añadieron: 4  $\mu\text{L}$  de Buffer de primera cadena 5X, 2  $\mu\text{L}$  de DDT a 0.1 M, 1  $\mu\text{L}$  de RNasa Out (40 U) y se incubaron a 42°C por 50 minutos. Finalmente fue inactivada la reacción por calor a 70°C por 15 minutos.

### **u) Análisis de la expresión de genes**

Se realizó la siguiente mezcla: 3  $\mu\text{L}$  cDNA a 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  mezcla de oligos (forward y reverse) cada uno a 10 pmol/ $\mu\text{L}$  o 10  $\mu\text{M}$ , 21  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 30  $\mu\text{L}$  SyBR Green Master Mix (2x). Se distribuyó esta mezcla en 3 pozos de una placa de 8x6 pozos, de forma que cada uno de ellos tuviera 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior, la placa fue colocada en equipo StepOne Real Time PCR System. Para realizar el análisis de expresión de genes, se resolvieron las siguientes fórmulas:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$$

$$(\Delta Ct1 = Ct_{gen\ x} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{muestra\ y}$$

$$(\Delta Ct2 = Ct_{gen\ x} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{muestra\ control}$$

### **v) Análisis de los metabolitos involucrados en la señalización**

Se pesaron y molieron 200-500 mg de material fresco. Se adicionó 1 mL de acetato de etilo y 10  $\mu\text{L}$  del estándar interno ácido 2-metoxibenzoico a una concentración de 0.1 mg/mL. Se dejó extraer a 4°C durante 12-24 horas. Se centrifugó por 3 minutos a 14,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y eliminó la fase acuosa y el material sólido.

Derivatización con 2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromide (PFB): se evaporó con nitrógeno gas y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, 100  $\mu\text{L}$  de *N,N*-diisopropiletilamina y 10  $\mu\text{L}$  de PFB. Se incubó a 60°C por 30 minutos. Posteriormente se evaporó con nitrógeno gas y se resuspendió con 200  $\mu\text{L}$  de metanol. Analizar por GC-EIMS.

Derivatización con *N,O*-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida BSTFA: se evaporó con nitrógeno gas y se resuspendió en 80  $\mu$ L de BSTFA y 20  $\mu$ L de piridina. Se calentó a 80°C por 30 minutos y se adicionaron 80  $\mu$ L de isooctano. Analizar en GC-EIMS.

Para la curva de calibración se utilizaron los estándares de ácido jasmónico y ácido salicílico. Se realizaron soluciones de 1 mg/mL, a partir de esta solución se realizaron diluciones para tener 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.001 mg/mL y 0.0001 mg/mL. Cada una de estas diluciones fueron derivatizadas y posteriormente inyectadas en el GC-EIMS y con los resultados se realizó la curva de calibración.

**w) Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EIMS)**

Se utilizó el equipo GC-EIMS. Método DEFMETDB1MSUI60M.M. La temperatura del horno se mantuvo por 3 minutos a 150°C, después la temperatura aumentó 4°C/minuto hasta 280°C donde se mantuvo por 25 minutos, el tiempo total de corrida fue de 60.5 minutos. La temperatura del inyector fue de 250°C y el flujo de helio de 1 mL/min.

Se realizó la adquisición de datos en modo SIM/SCAN, desde 50-550 m/z. Los parámetros para SIM fueron los siguientes:

Tiempo inicial (min)	Tiempo final (min)	Compuesto	Iones M/Z
5	8.5	Ácido benzoico	105, 194, 135, 179
8.5	10	Metil salicilato	179, 209, 224
10	11	Estándar interno de SA	135, 209, 224
11	12.2	Ácido salicílico	121, 194, 267, 281, 282
12.2	13.5	Ácido cinámico	103, 161, 205, 220
13.5	16.5	Metil jasmonato	109, 151, 224
16.5	18.4	Ácido jasmónico	117, 151, 153, 214, 282, 284
18.4	35	Ácido azelaico	201, 317, 331
35	60.5	Diadzeina	184, 190, 383, 398

## PARTE EXPERIMENTAL

### ***a) Activación de priming en plantas de frijol Negro Querétaro***

En un primer experimento, la variedad de frijol común empleada fue Negro Querétaro. Como activador se empleó una solución de afinina a una concentración de  $600 \mu\text{M}$  diluida en una solución de etanol 10%. Este activador se aplicó por aspersion a las plantas de los distintos tratamientos (Tabla 1) y posteriormente las plantas se inocularon con el patógeno *P. syringae pv phaseolicola* (por herida).

<b>Afinina</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Agua-etanol</b>	<b>Nombre de tratamiento</b>
+	+	+	AP (Afinina-Patógeno)
+	-	+	A (Afinina)
-	+	-	P (Patógeno)
-	-	+	ET (Etanol-agua)
-	-	-	C (control)

La toma de muestra se realizó 5 días después de la infección. Se tomó una muestra por cada réplica biológica (3 réplicas biológicas), posteriormente se realizó un duplicado técnico durante el procesado de la muestra. De forma que se tuvieron 6 réplicas en total para cada tratamiento.

### ***b) Activación de priming en plantas de frijol BAT93***

Debido a la resistencia contra el patógeno que presentó la variedad Negro Querétaro, se decidió emplear para futuros experimentos la variedad de frijol común BAT93. Esta variedad fue tratada con afinina tanto por aspersion como por riego, a dos distintas concentraciones (Tabla 2), para posteriormente ser infectada con *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* (por infiltración).

Forma	Afinina	Afinina en extracto
Aplicación	Asperjada	Regada
Concentración	600 $\mu M$	200 $\mu M$

El número de tratamientos fue de 20 en total, 16 de ellos fueron para el análisis general y 4 fueron controles (Tabla 3).

Forma		Afinina pura				Afinina en extracto			
Aplicación		Asperjada		Regada		Asperjada		Regada	
C $\mu M$		200	600	200	600	200	600	200	600
Patógeno	Si	AAP200	AAP600	ARP200	ARP600	EAP200	EAP600	ERP200	ERP600
	No	AA200	AA600	AR200	AR600	EA200	EA600	ER200	ER600

Controles:

- Plantas con patógeno (Nombre del tratamiento: P).
- Plantas asperjadas con etanol 10% (Nombre del tratamiento: EAA).
- Plantas regadas con etanol 10% (Nombre del tratamiento: EAR).
- Plantas control (Nombre del tratamiento: C).

### **Determinación del gen *PvPR1***

Se realizó el análisis del gen *PvPR1* en hojas de frijol antes y después de la aplicación de la afinina, antes y después de la inoculación de la bacteria en los trifolios, y 5 días después de la infección. Cabe mencionar que para realizar el análisis de expresión de genes no se utilizó el tejido infectado, sino el trifolio superior al infectado (Figura 13).

El análisis de la expresión del gen *PvPR1* se realizó para plantas que fueron regadas con una solución de afinina a 600  $\mu M$ . Los tratamientos fueron control=C, riego con 100 mL de etanol 10%=E, riego con la solución de afinina 600  $\mu M$ =A, infección con la



bacteria en plantas que fueron regadas con 100 mL de solución de afinina  $600 \mu M = AP$ , infección con la bacteria *P. syringae*=P (Gráfico 1).



**Figura 13. Aplicación de la solución de afinina y patógeno en la planta.**

La aplicación de la afinina se realiza en el primer trifolio, la inoculación de la bacteria se realiza en el segundo trifolio y la toma de muestra se realiza en el tercer trifolio.

### **Cuantificación de semillas por planta y por vaina**

La determinación de número de semillas por planta se realizó al término del cuarto mes.

### **Cuantificación de peso seco de la parte aérea**

La determinación de peso seco se realizó tomando sólo el tallo de las plantas de frijol, debido a que las raíces son muy delgadas y se rompen fácilmente.

### **c) Cinética de crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola***

Con el fin de determinar el efecto de la afinina en el crecimiento del patógeno, en 150  $\mu L$  de medio KB con sulfato de magnesio y rifampicina, se adicionó la afinina y un inóculo de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. El análisis de la cinética se realizó

en cajas Elisa, las cuales se colocaron a 28°C y cada 4 horas se realizó la medición de la DO a 600 nm de longitud de onda.

Las variables empleadas fueron las siguientes: 50  $\mu M$ , 200  $\mu M$ , 600  $\mu M$ , 1200  $\mu M$  de afinina.

Se utilizaron dos blancos: a) blanco 1: Medio KB+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +Rifampicina y b) blanco 2: Medio KB+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +Rifampicina+etanol

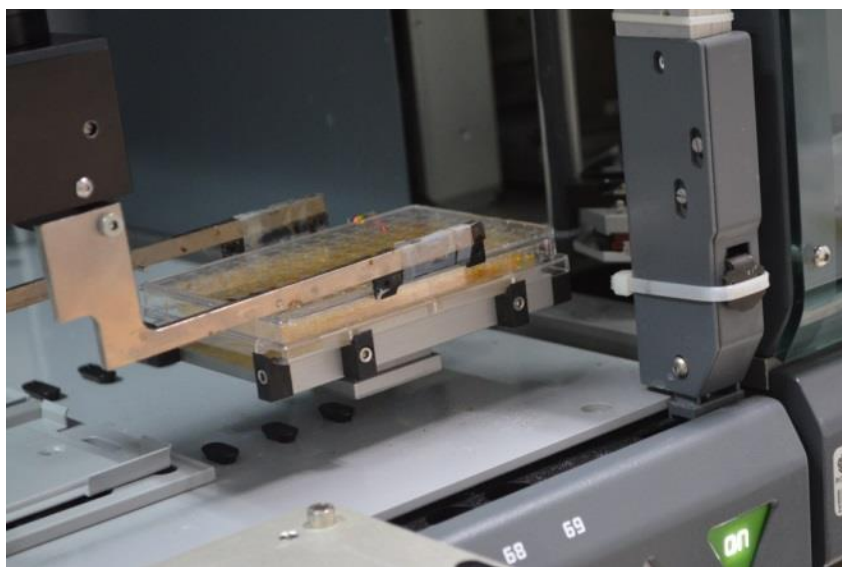


Figura 14. Robot utilizado para el estudio de las cinéticas de crecimiento.

#### d) *Cuantificación de UFCs*

Para la determinación de UFCs en la variedad de frijol común BAT93 todos los tratamientos son infectados con la bacteria *P. syringae*, por infiltración. Para este experimento el activador fue la aplicación de una solución de afinina (Tabla 4).

Tabla 4. Forma de aplicación de afinina para la determinación de UFC.		
Forma	Afinina	Afinina en extracto
Aplicación	Asperjada	Regada
Concentración	600 $\mu M$	60 $\mu M$

El número total de tratamientos fueron 13. En la Tabla 5 se describen cada uno de ellos en color naranja. Control: plantas que sólo están infectadas con patógeno=(P).

Forma	Afinina pura				Afinina en extracto			
Aplicación	Asperjada		Regada		Asperjada		Regada	
Concentración $\mu M$	60 $\mu M$	600	60	600	60	600	60	600
Antes de la infección	AAP60	AAP600	ARP60	ARP600	EAP60	EAP600	ERP60	ERP600
Después de la infección	AASP60	AASP600			EASP60	EASP600		

Cada tratamiento tuvo un triplicado biológico, se realizaron dos tomas de muestra por cada réplica biológica y se realizó un segundo duplicado técnico durante en análisis. Al final se obtuvieron 12 réplicas por cada tratamiento.

### Aplicación del activador antes del patógeno

Se utilizaron los siguientes tratamientos para determinar el efecto del activador en el crecimiento del patógeno: AAP60, AAP600, ARP60, ARP600, EAP60, EAP600, ERP60, ERP600 y P (control) (figura 15).



Figura 15. Metodología utilizada para la determinación de UFC cuando la afinina es aplicada antes de la inoculación del patógeno.

### Aplicación del activador después de la inoculación del patógeno

Para determinar el efecto de la aplicación del activador después de la inoculación del patógeno, se utilizaron los tratamientos: AAPS60, AAPS600, EAPS60, EAPS600 y P (Figura 16).

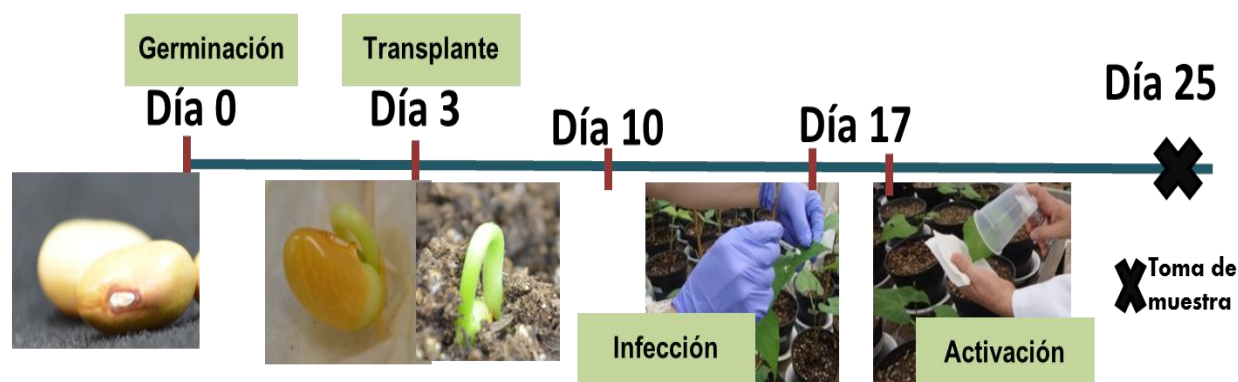


Figura 16. Metodología para la determinación de UFC cuando el activador es aplicado después del patógeno.

En este experimento no se aplicó el activador al día 10 sino que, hasta el día 17 se realizó la inoculación de la bacteria por infiltración y 4 horas después se asperjó el activador (afinina o extracto). La toma de muestra se realizó 8 días después de la infección (Figura 16).

#### *e) Análisis de los metabolitos involucrados en la señalización*

Para la determinación de metabolitos en material vegetal fue necesario estandarizar las condiciones de reacción como temperatura de reacción, tiempo de reacción y tipo de reacción.

#### **Determinación de las condiciones de derivatización con BSTFA**

Para la determinación del tiempo de reacción con BSTFA, se utilizó el estándar de SA y se varió el tiempo de reacción.

- 30 minutos
- 45 minutos

- 60 minutos
- 120 minutos

Para la determinación de la temperatura óptima de reacción con BSTFA, se utilizó el estándar de SA y se hizo reaccionar por 30 minutos, cambiando únicamente la temperatura.

- 80 °C
- 120 °C

La piridina funciona como un catalizador de la reacción, para determinar si es necesaria o no la aplicación de piridina para que la reacción se efectúe más rápido. Se llevaron a cabo reacciones a 80°C por 30 minutos, una con piridina y la otra sin piridina.

- Con piridina (CP).
- Sin piridina (SP).

### **Comparación entre la derivatización con BSTFA y con PFB**

Para realizar este análisis se realizaron derivatizaciones de los siguientes estándares: SA, JA, ácido azelaico (AA), ácido benzoico (AB), ácido cinámico (AC), diadzeína (D), metil jasmonato (MJ) y metil salicilato (MS).

### **Elección del solvente para extraer los metabolitos de muestra vegetal**

Se utilizó material vegetal y se realizaron las extracciones con los siguientes solventes.

- Acetato de etilo (AE)
- Etanol (E)
- Metanol (M)

Las muestras fueron derivatizadas con BSTFA y analizadas por GC-EIMS.

### **Determinación de JA y SA en plantas de frijol después de la aplicación de afinina**

Al día 10 se realizó la aplicación de afinina asperjada a 600  $\mu M$  (Figura 17). Para este experimento se utilizaron 3 tratamientos (Tabla 6) y se tomaron muestras a las 2, 4, 8,

16, 24 y 48 h después de la activación. Para cada tratamiento y cada toma de muestra se contó con 3 muestras biológicas. Con un total de 54 plantas (Tabla 7).



Figura 17. Metodología para el análisis de metabolitos en plantas con afinina.

Tratamiento	Nombre
Plantas asperjadas con afinina 600 $\mu M$	A
Plantas asperjadas con la mezcla etanol-agua	E
Plantas control	C

Tiempo de toma de muestra dda	Número de plantas en cada toma de muestra dda					
	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h
C	3	3	3	3	3	3
A	3	3	3	3	3	3
E	3	3	3	3	3	3

### Activación con afinina y patógeno

Plantas de frijol común fueron activadas al día 10 e inoculadas con patógeno al día 17. A partir de ese momento se inició la toma de muestras para el análisis de metabolitos (Figura 18). Para este experimento se utilizaron 4 tratamientos como se indica en tabla 8 y se tomaron muestras a las 2, 4, 8, 16, 24 y 48 h después de la infección con la

bacteria. Para cada tratamiento y cada toma de muestra se contó con 3 muestras biológicas. Con un total de 72 plantas (Tabla 9).



Figura 18. Metodología para el análisis de metabolitos en plantas con afinina y patógeno.

Tabla 8. Tratamientos utilizados en la determinación de metabolitos en plantas con A+P.

Tratamiento	Nombre
Plantas infectadas con patógeno	P
Plantas asperjadas con etanol-agua e infiltradas con agua.	ED
Plantas asperjadas con afinina e infectadas	AP
Plantas asperjadas con etanol e infectadas	EP

Tabla 9. Toma de muestra después de la aplicación del patógeno (ddp).

Tiempo de toma de muestra ddp	Número de plantas en cada toma de muestra ddp					
	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h
C	3	3	3	3	3	3
ED	3	3	3	3	3	3
AP	3	3	3	3	3	3
P	3	3	3	3	3	3

## RESULTADOS

### x) Activación de priming en plantas de frijol Negro Querétaro

#### % de germinación

El porcentaje de germinación del frijol común variedad Negro Querétaro fue de 81% a los 3 días después de la desinfección de semillas.

$$\%_{Germinación} = \frac{128}{157} \times 100 = 81.52\%$$

#### Síntomas de infección

Los síntomas de la infección después de aplicar el patógeno (ddp) fueron clorosis, tejido vegetal delgado y necrosis. En la variedad Negro Querétaro, no se observan síntomas de enfermedad de tizón de halo en las plantas infectadas con *P. syringae* a los 5, 7, 8 ni 15 días después de la infección (ddp) (Figura 19).

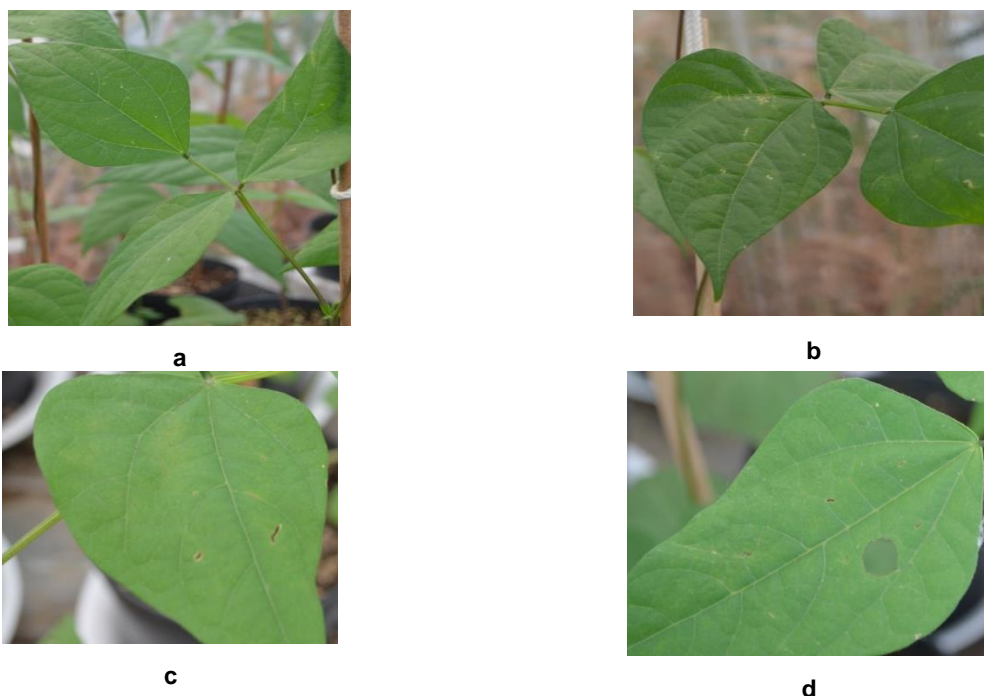
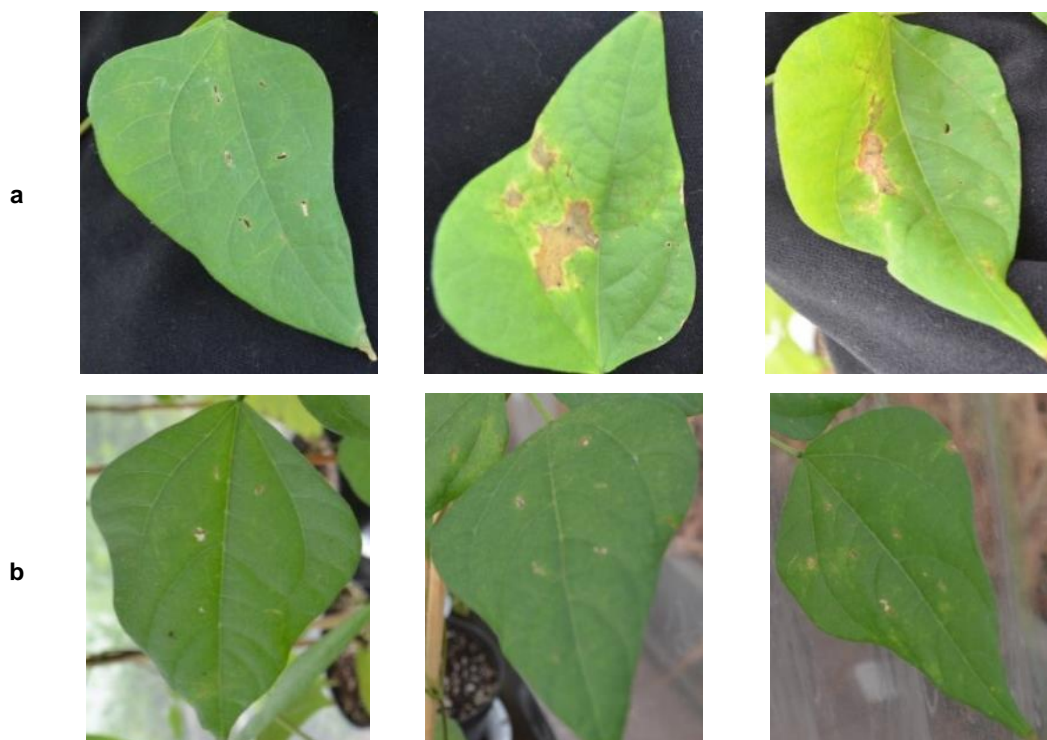


Figura 19. Síntomas en plantas de frijol Negro Querétaro con patógeno y afinina+patógeno.

No se presentan síntomas de infección en ninguno de los tratamientos a) a los 5 ddp, b) a los 7 ddp ni c) a los 8 ddp y d) a los 15 ddp.



Hasta los 21 días, plantas que fueron infectadas con la bacteria mostraron clorosis y necrosis, sin embargo, los síntomas se observan sólo en 3 réplicas biológicas de 12 totales (Figura 20-a). Plantas que fueron infectadas con la bacteria y que previamente fueron asperjadas con afinina, no presentaron síntomas de enfermedad del tizón de halo por *P. syringae* (Figura 20-b).



**Figura 20. Plantas de frijol Negro Querétaro a los 21 ddp.**

A los 21 ddp a) 3 plantas de 12 totales con patógeno (P) muestran síntomas de infección, en cambio b) ninguna planta con afinina-patógeno (AP) muestra síntomas de infección.

### ***y) Activación de priming en plantas de frijol BAT93***

#### **% germinación**

El porcentaje de germinación de frijol común variedad BAT93 fue de 91.6%.

$$\%_{Germinación} = \frac{120}{131} \times 100 = 91.6\%$$



Figura 21. Porcentaje de germinación de semillas de frijol BAT93.

### Síntomas de infección

Los síntomas de la infección se observaron más drásticos en los tratamientos con afinina y extracto asperjado, se observó clorosis, tejido delgado y necrosis en el área de infección. Los tratamientos con menor daño (visual) fueron los tratamientos de afinina y extracto a  $600 \mu M$  (Figura 22).

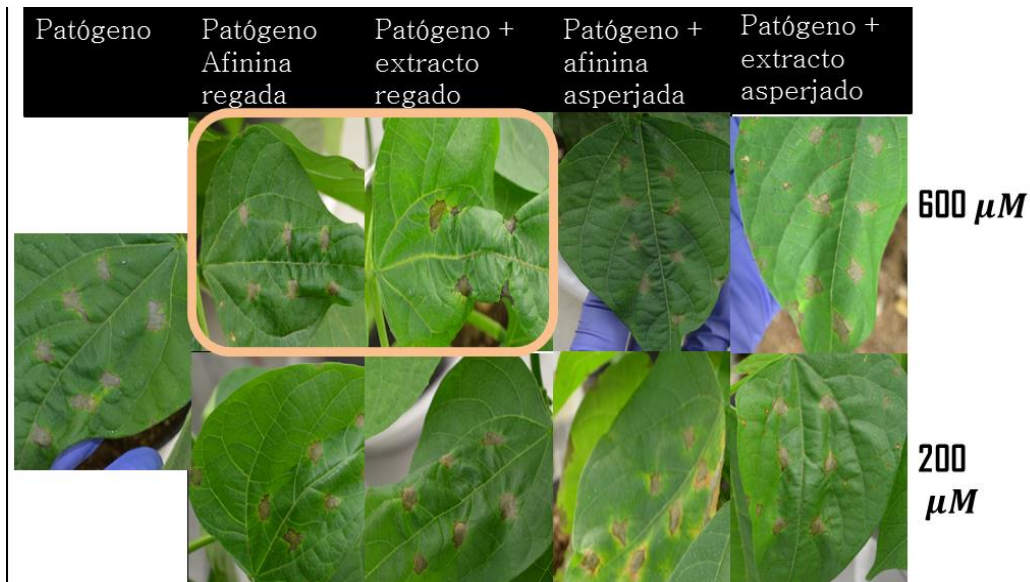


Figura 22. Síntomas de infección 5 ddp con frijol BAT93.

## Determinación del gen PvPR1

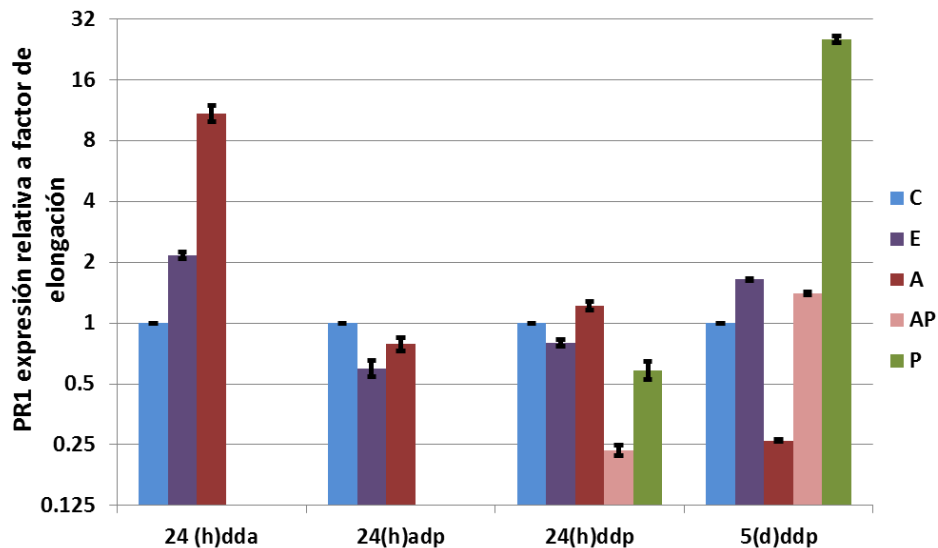


Gráfico 1. Expresión del gen PvPR1 en plantas de frijol BAT93.

Expresión del gen *PvPR1* en plantas de frijol variedad BAT93 dda (después del activador), adp (antes del patógeno) y ddp (después del patógeno).

C=control, E=etanol, A=afinina, AP=afinina+patógeno, P=patógeno

24 horas después de la aplicación de la afinina se observa un aumento de aproximadamente 10 veces la expresión del gen *PvPR1* en plantas tratadas con afinina (A).

Plantas que fueron inoculadas con la bacteria y previamente regadas con la solución de afinina  $600 \mu M$  disminuyeron la expresión del gen.

Se realizó una prueba de ANOVA y prueba de Tukey con una significancia de  $p < 0.05$ .

## Determinación de semillas

Se puede observar que las plantas que fueron regadas con afinina  $200 \mu M$  disminuyeron la cantidad de semillas por planta (Gráfico 2).

Las plantas que fueron regadas y asperjadas con la solución de etanol al 10% disminuyeron significativamente la producción de semillas (Gráfico 2-5). Entre los

tratamientos con la solución de afinina asperjada tanto a 200 como 600  $\mu M$ , no mostraron diferencias significativas, tal parece que no afecta ni favorece la producción de semilla (Gráfico 3). En cambio, plantas regadas con esta misma solución si mostraron diferencias en algunos tratamientos como la disminución de producción de semilla en el tratamiento con la solución de afinina 200  $\mu M$  (Gráfico 2). Por otro lado, se observa que el extracto regado aplicado en forma regada si aumenta la producción de semillas por planta, este incremento es ligero (Gráfico 4). Este efecto se observa más marcado en los mismos tratamientos con extracto, pero aplicado de forma regada (Gráfico 5).

Se observa también que tanto en los tratamientos con afinina como con extracto, el aumento de producción de semilla se presenta generalmente en combinación con la aplicación del patógeno (Gráfico 2-5), siguiendo claro el proceso de activación de *priming* mostrado en la Figura 11, aplicando el activador y patógeno en tejidos sistémicos como se muestra en la Figura 13.

### **Peso seco**

No hay diferencias significativas en la producción de biomasa entre plantas infectadas y plantas control (Gráfico 6-9). En las plantas que se favorece la producción de biomasa son aquellas tratadas con: afinina regada 600  $\mu M$  y que posteriormente son infectadas (Gráfico 6), afinina asperjada a 600  $\mu M$  (Figura 7), extracto regado a 600  $\mu M$  y 200  $\mu M$  que posteriormente son infectadas. En los tratamientos en los cuales se aplicó el activador de forma asperjada, no se observan cambios significativos en la producción de biomasa. En cambio, las plantas tratadas con activador aplicado en forma de riego, si aumentan la producción de biomasa, es importante mencionar que en éstos tratamientos se observa nuevamente que la combinación entre activador y patógeno aumenta la producción de biomasa (Gráfico 6 y 8).

La descripción de cada uno de los tratamientos, así como la nomenclatura usada para nombrarlos se encuentra explicado en la Tabla 3 en el apartado de experimentos.

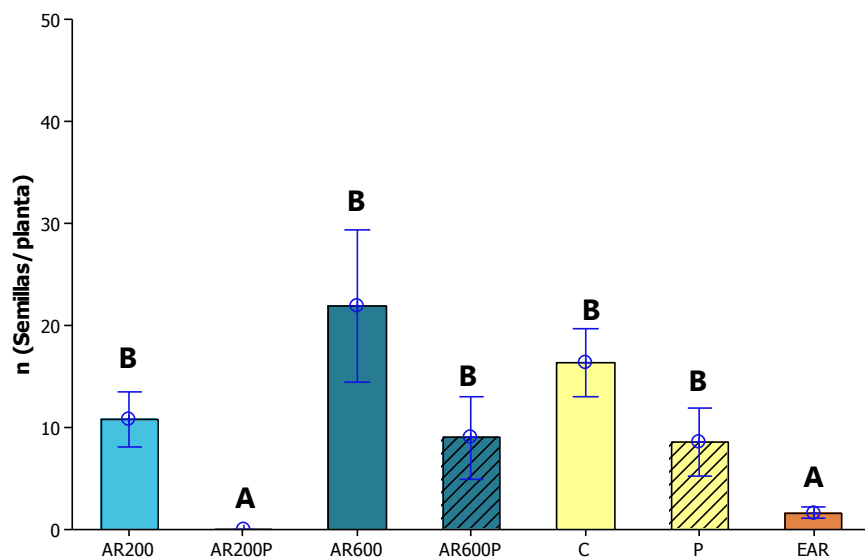


Gráfico 2. Cantidad de semillas en plantas tratadas con afinina regada ( $p < 0.05$ ).

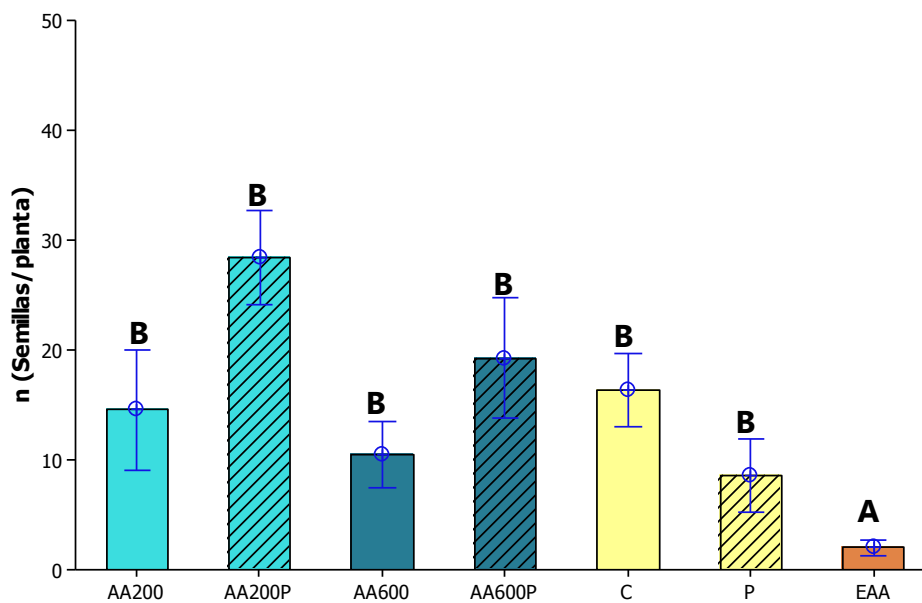


Gráfico 3. Cantidad de semillas en plantas tratadas con afinina asperjada ( $p < 0.05$ ).

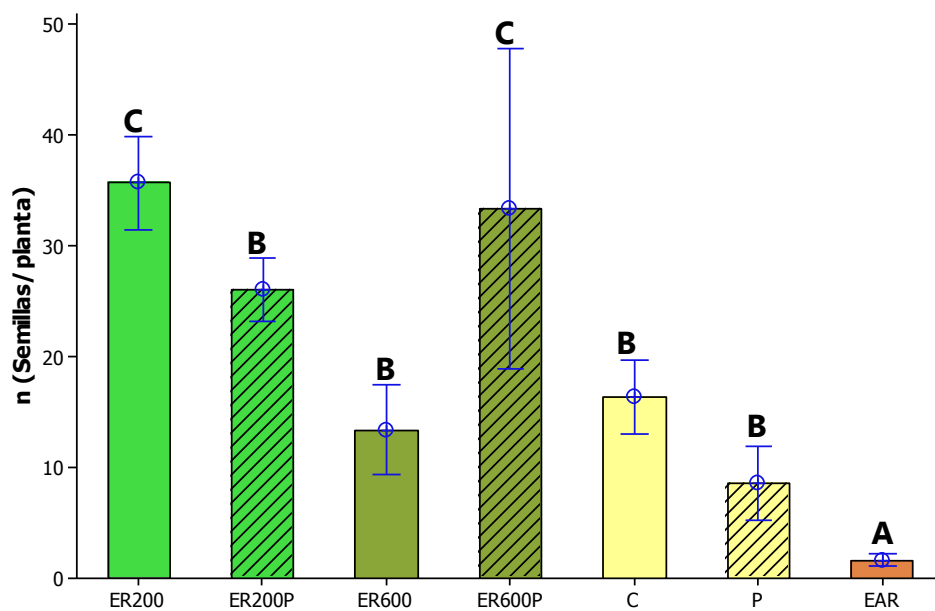


Gráfico 4. Cantidad de semillas en plantas tratadas con extracto regado ( $p < 0.05$ ).

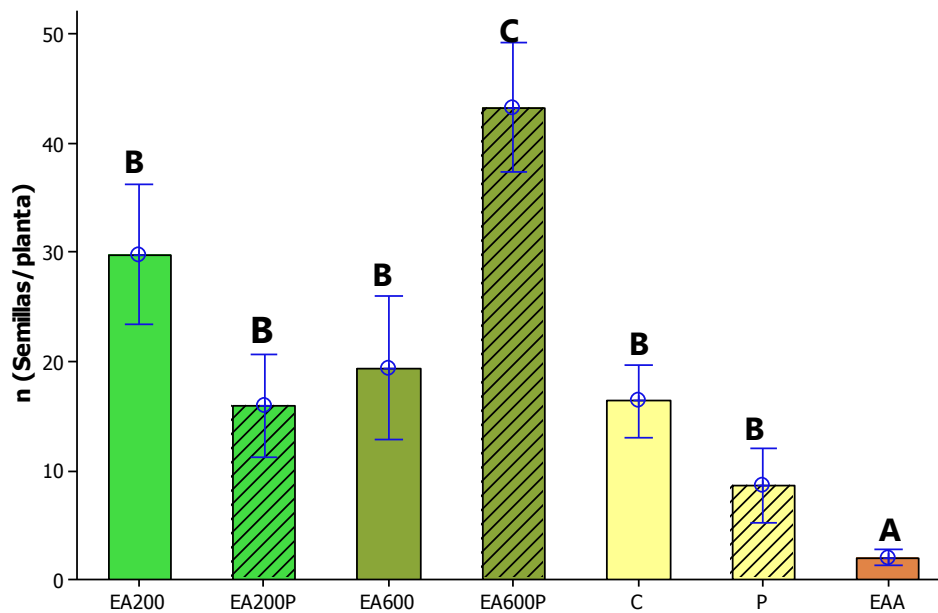


Gráfico 5. Cantidad de semillas en plantas tratadas con extracto asperjado ( $p < 0.05$ ).

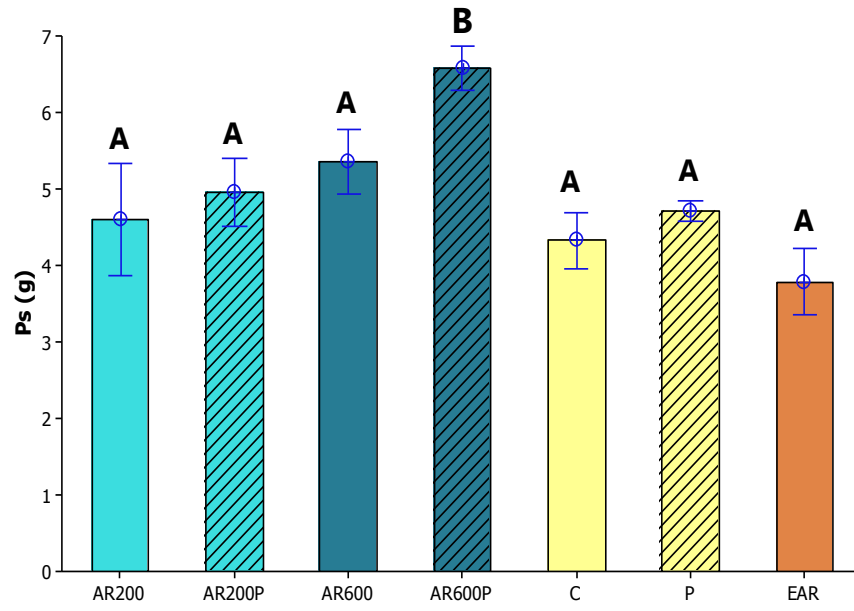


Gráfico 6. Análisis de peso seco en plantas que fueron regadas con afinina ( $p < 0.05$ ).

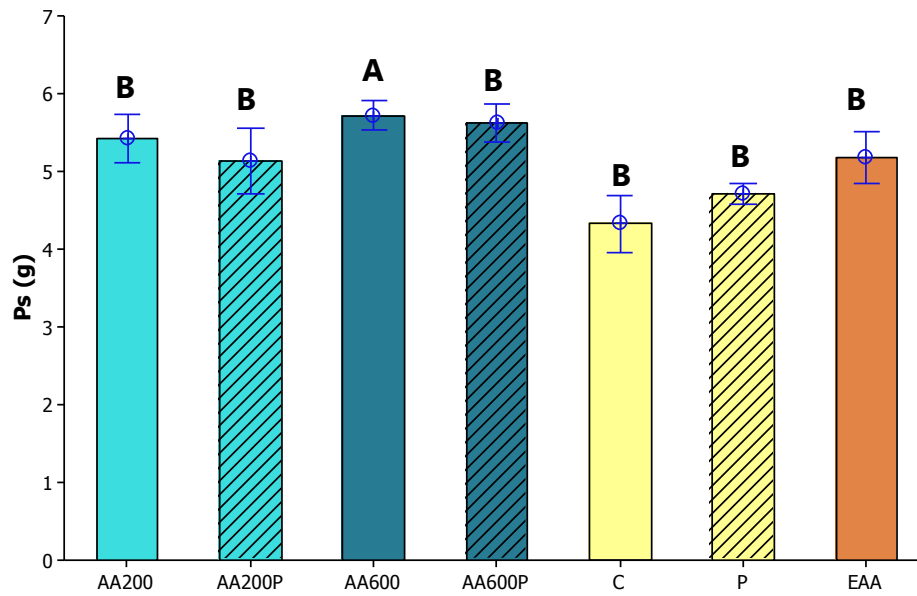


Gráfico 7. Análisis de peso seco en plantas que fueron asperjadas con afinina ( $p < 0.05$ ).

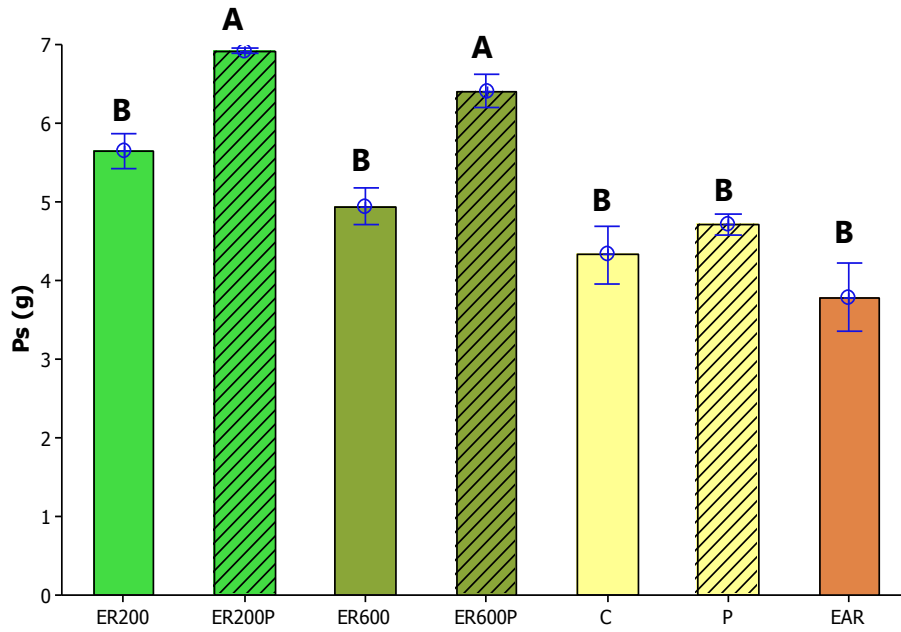


Gráfico 8. Análisis de peso seco en plantas que fueron regadas con extracto de *H. longipes* ( $p < 0.05$ ).

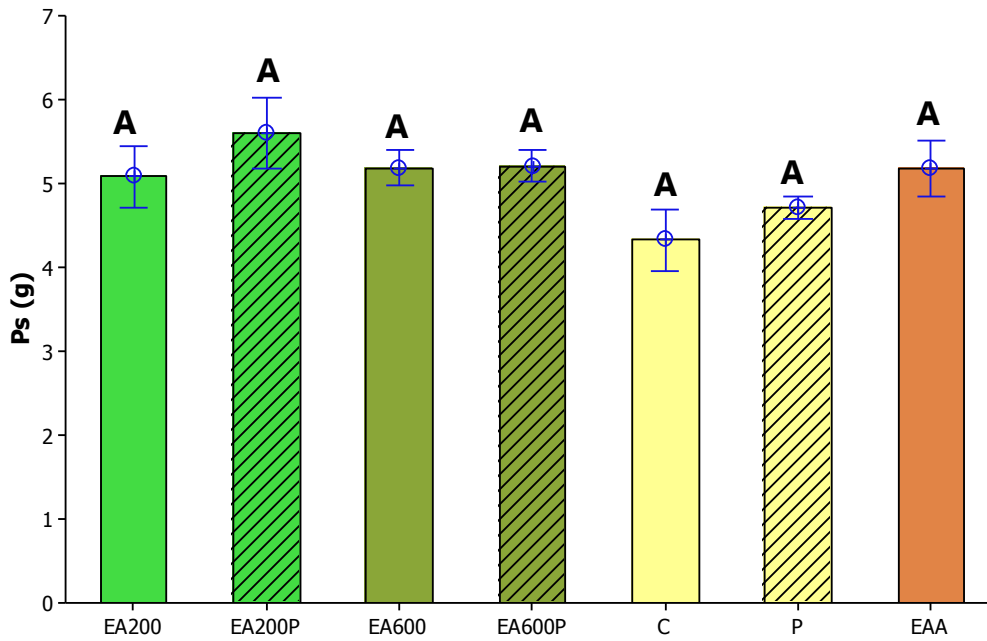


Gráfico 9. Análisis de peso seco en plantas que fueron asperjadas con extracto de *H. longipes* ( $p < 0.05$ ).



### Cuantificación de ácido jasmónico

Por medio del análisis de GC-EIMS se encontró que hubo un aumento significativo de ácido jasmónico en plantas que fueron regadas con una solución de afinina a 600  $\mu\text{M}$  y fueron infectadas con la bacteria AR600P (Gráfico 10). Plantas que sólo fueron regadas con afinina o plantas que sólo fueron infectadas no presentan aumento significativo de JA.

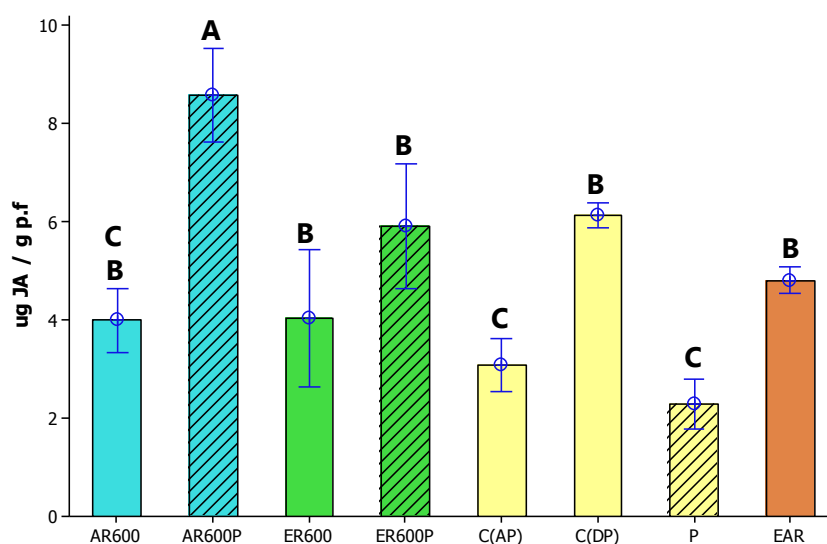


Gráfico 10. Determinación de JA en plantas que fueron regadas con afinina y extracto 600  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento de C (DP) y C (AP) se refieren a lotes de plantas control (sin patógeno ni activador). C(AP) fueron plantas que se utilizaron para la toma de muestra antes del día 17, antes de inocular los otros tratamientos con patógeno. C(DP) fueron plantas que se utilizaron para la toma de muestra después del día 17, después de inocular el patógeno en otros tratamientos. Se observa un aumento en los niveles de JA en el lote C(DP), a pesar de ser un grupo control, en el ambiente hubo algo que indujo la producción de JA.

Tabla 10. Descripción de los tratamientos utilizados para análisis de JA.			
Tratamiento	Abrev.	Tratamiento	Abrev.
Control antes de la infección	C(AP)	Afinina 600 $\mu M$ regado	AR600
Control después de la infección	C(DP)	Extracto 600 $\mu M$ regado	ER600
Patógeno	P	Afinina 600 $\mu M$ regado + Patógeno	ARP600
Etanol: Agua regado	EAR	Extracto 600 $\mu M$ regado + Patógeno	ERP600

### ***z) Cinética de crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola****

Con base en la cinética de crecimiento se observó que la afinina no presenta toxicidad para la bacteria *P. syringae*, al menos no a las concentraciones utilizadas. La cinética muestra que la bacteria normalmente a las 38 horas después del inicio de la cinética de crecimiento llega a la fase estacionaria. Para el caso de los cultivos que fueron adicionados con afinina a 600 y 1200  $\mu M$ , la fase estacionaria inicia a las 25 h después del comienzo de la cinética (Gráfico 11).

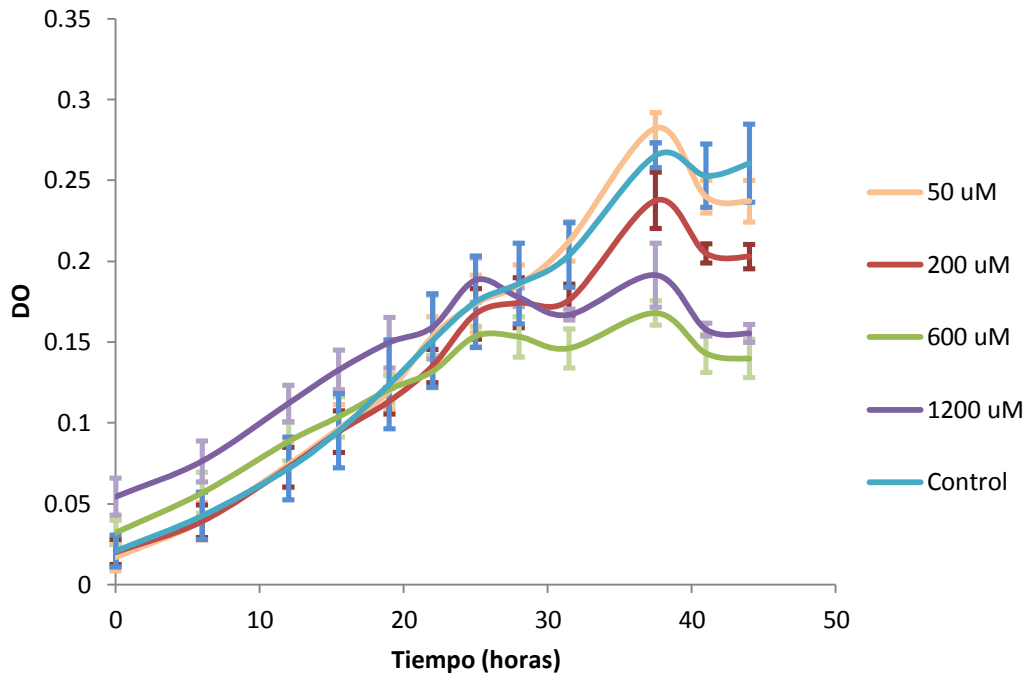
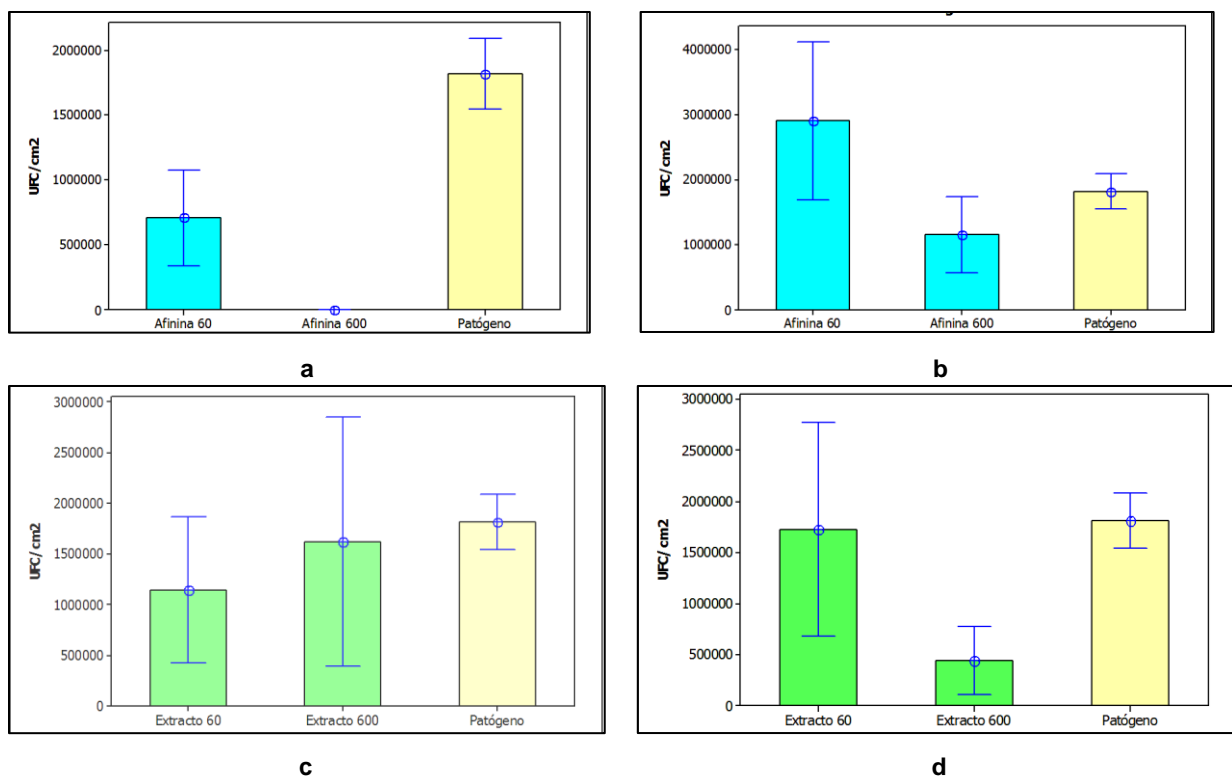


Gráfico 11. Cinética de crecimiento de *P. syringae pv phaseolícola*.

### aa) *Determinación de UFC*

#### **Aplicación del activador antes del patógeno**

La toma de muestra se realizó 8 días después de la infección (Gráfico 12), debido a que, hasta ese momento, las plantas empezaron a mostrar síntomas de enfermedad como clorosis. El análisis de UFCs se muestra en los gráficos 12a- 12d.



**Gráfico 12. Análisis de UFC en frijol BAT93.**

Análisis de UFC en plantas a) asperjadas con una solución de afinina, b) regadas con una solución de afinina, c) asperjadas con una solución de extracto y regadas con una solución de extracto ( $p < 0.05$ ).

Para determinar el efecto tanto de la afinina o de la afinina en extracto, sin considerar la forma de aplicación ni la concentración, se realizó una prueba de ANOVA y t-student.

Para determinar la relevancia del tipo de activador (afinina, extracto o control marcado como "No") se realizó una prueba comparativa donde sólo se tomó los factores de: tratamiento con afinina, con extracto o con ninguno de los dos anteriores. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos, para afinina ( $p = 0.06594$ ) y extracto ( $p = 0.2707$ ) en comparación con el control.

Para determinar si la concentración de los activadores tiene efecto sobre las unidades formadoras de colonias, se realizó una prueba de t-student comparando la concentración de  $60 \mu M$  y  $600 \mu M$  de activador (No se toman en cuenta el tipo de activador, ya sea afinina o extracto, ni se toma en cuenta la forma de aplicación) en comparación con el grupo " $0 \mu M$ " (en este grupo se encuentra el control con patógeno, el control -sin activador ni patógeno- y los controles de etanol 10% asperjado y regado).

Se observó que las plantas que fueron tratadas con activador 600  $\mu M$  disminuyeron la cantidad de UFC con  $p=0.03088$  (Gráfico 14).

Para determinar si la forma de aplicación del activador tiene efecto sobre las UFC, se realizó una prueba t-student, donde se compararon los resultados de UFC de los tratamientos en los cuales se aplicó el activador de forma regada y de forma asperjada contra los resultados de grupo denominado "NO" (En este grupo se encuentra el control con patógeno y el control -sin activador ni patógeno-). No se tomaron en cuenta el tipo de activador ni su concentración. Se observa que la aplicación de forma asperjada del activador disminuye las UFC con un  $p=0.047$  (Gráfico15).

De acuerdo a los resultados de unidades formadoras de colonias (UFC), el activador disminuye las unidades formadoras de colonias cuando es aplicado a la concentración de 600  $\mu M$  (Gráfico 14) y aplicado por aspersion (Gráfico 15) ( $p<0.05$ ).

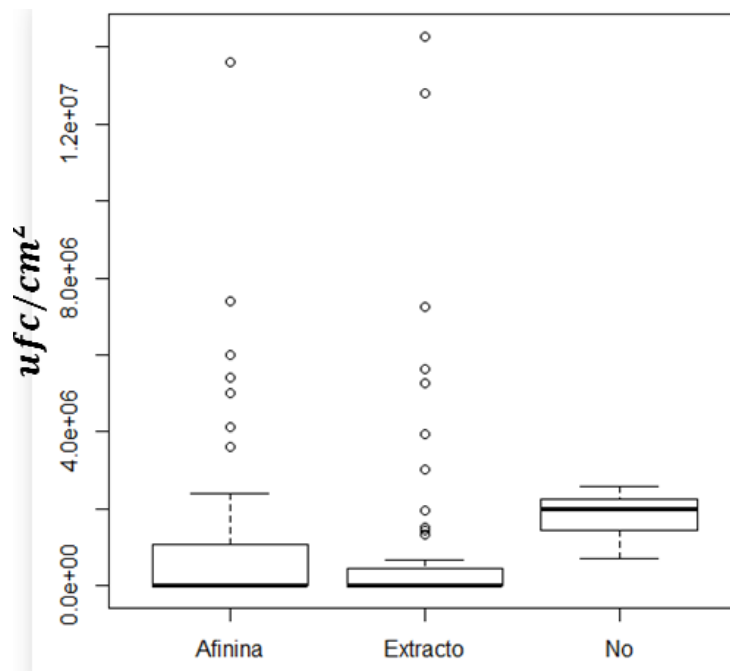


Gráfico 13. Determinación de UFC en función del activador ( $p<0.05$ ).

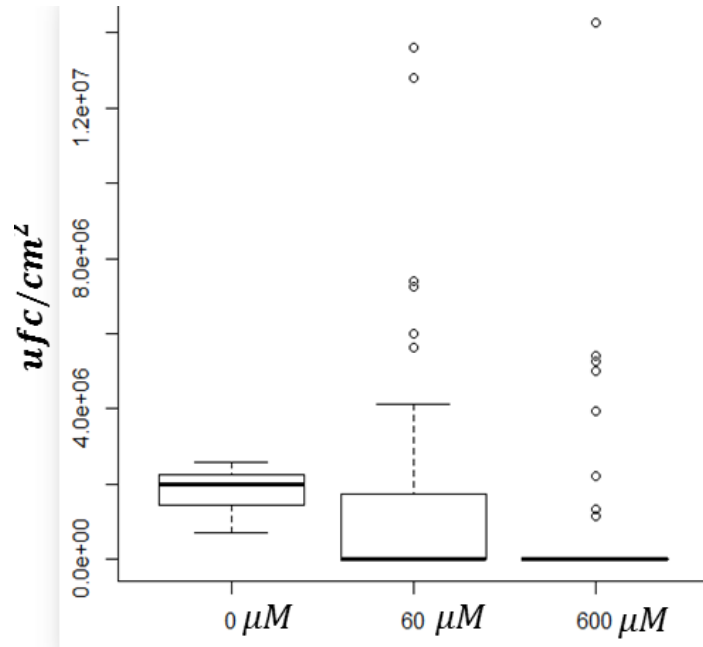


Gráfico 14. Determinación de UFC en función de la concentración del activador ( $p < 0.05$ ).

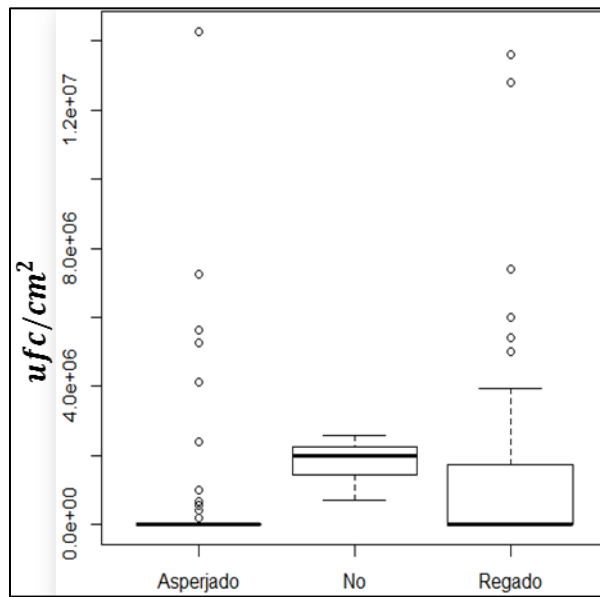
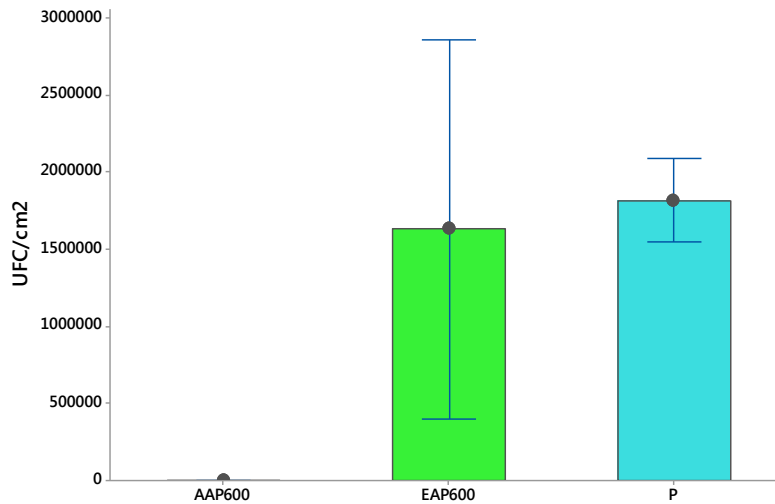


Gráfico 15. Determinación de UFC en función de la forma de aplicación del activador ( $p < 0.05$ ).

En base a lo anterior se compararon los tratamientos que fueron asperjados con una solución de activador a  $600 \mu M$ . Se realizó una prueba de Tukey, donde se observa que la afinina asperjada a  $600 \mu M$  evita la proliferación de la bacteria cuando la planta es infectada ( $p < 0.05$ ) (Gráfico 16). Se realizó una prueba de ANOVA con una significancia de  $p < 0.05$ .

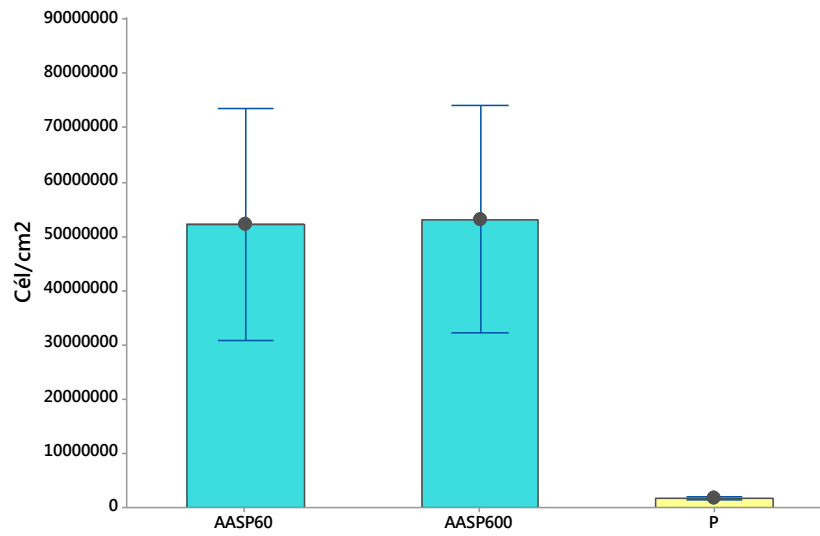


**Gráfico 16. Plantas tratadas con afinina asperjada a  $600\mu M$ , evitan la proliferación de la bacteria ( $p < 0.05$ ).**

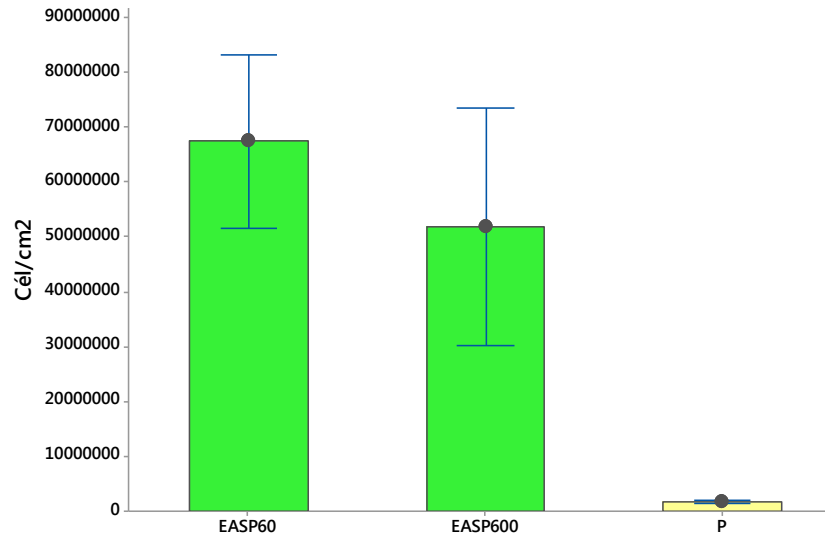
### **Aplicación del activador después de la inoculación del patógeno**

Es importante mencionar que el valor de UFC para el control (el tratamiento P en los Gráficos 17 y 18, y el lote nombrado “No” en el Gráfico 19) tiene el mismo valor que el mostrado en el experimento donde el activador se aplica antes del patógeno (tratamiento mostrado como P en los Gráficos 12-16).

Los resultados muestran que tanto la afinina como el extracto aumentan drásticamente las unidades formadoras de colonias ( $p < 0.05$ ) (Gráficos 17-18), siendo el extracto el que incrementa en mayor medida las UFCs (Gráfico 18). La aplicación del activador tiene diferente respuesta en las UFCs si se aplica antes o después de la infección, como se observa en el gráfico 19, el activador aumenta hasta casi 10 veces las UFC si se aplica después de la inoculación con la bacteria ( $p < 0.05$ ).



**Gráfico 17. Determinación de UFC en plantas tratadas con afinina asperjada 4 h ddp ( $p < 0.05$ ).**



**Gráfico 18. Determinación de UFC en plantas con extracto asperjado 4 h ddp ( $p < 0.05$ ).**



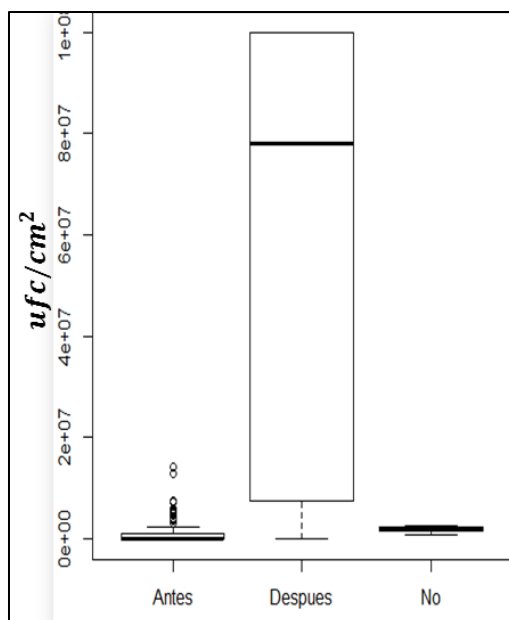


Gráfico 19. Determinación de UFC cuando el activador es aplicado antes y después del patógeno (p<0.05).

**bb) Determinación de los metabolitos involucrados en la señalización**

La molécula de SA tiene un peso molecular de 138 m/z (Figura 23), tiene dos grupos hidroxilo por lo que cuando se derivatiza con BSTFA, dos iones de trimetilsilil se adicionan a la molécula de SA, dando un peso molecular final de 282 m/z (Figura 24).

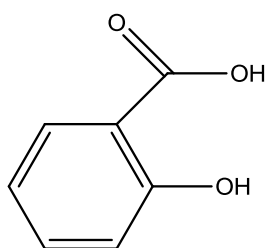


Figura 23. Estructura del ácido salicílico, PM=138 m/z.

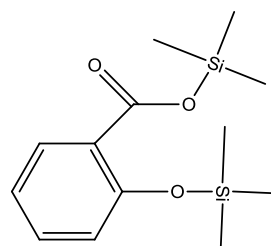


Figura 24. Estructura del SA con dos iones trimetilsilil adicionados a la molécula, PM=282.

El espectro de masas del ácido salicílico derivatizado muestra un ión mayoritario de 267, debido a la ruptura de un grupo metilo en la estructura. El espectro de masas tiene los siguientes iones mayoritarios y su abundancia m/z: 267 (100), 73 (42), 268(24), 135

(13), 269 (10) (Figura 25). No hay diferencia en la producción de SA derivatizado con los tiempos de reacción de 30, 45 (Figura 26), 60 (Figura 27) y 120 (Figura 29) minutos.

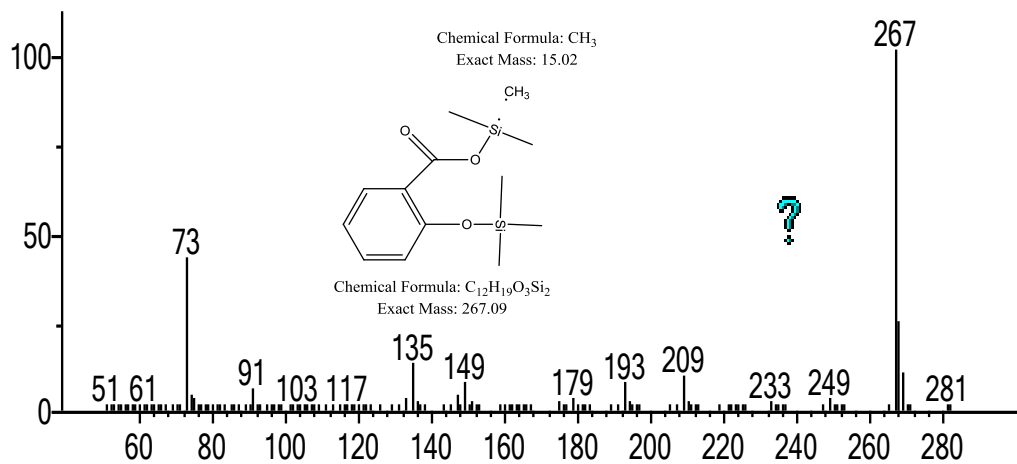


Figura 25. Espectro de masas del ácido salicílico derivatizado con BSTFA.

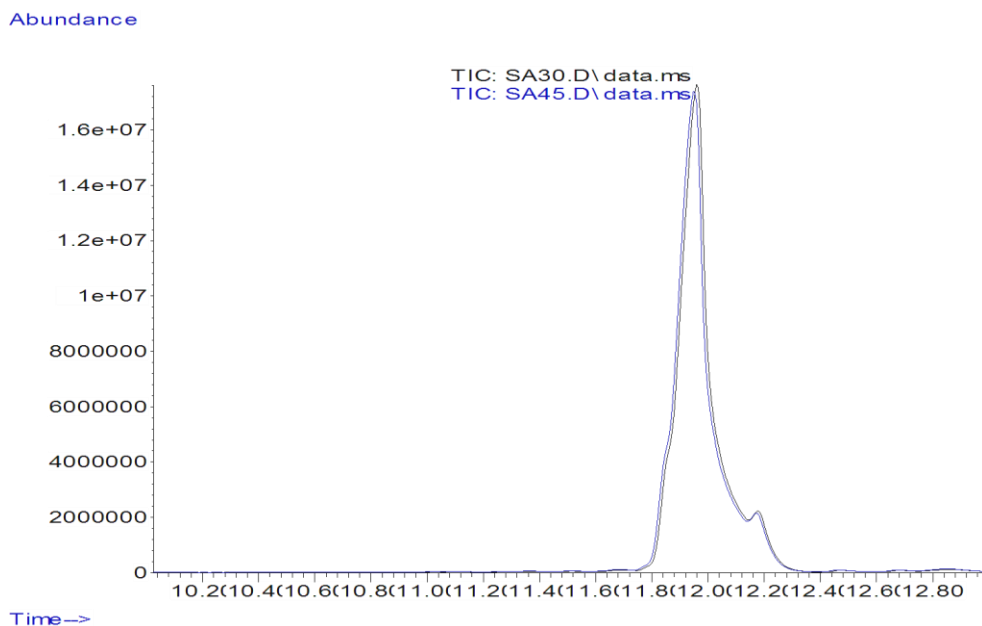


Figura 26. Cromatogramas de AS derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 45 minutos (azul) de reacción.

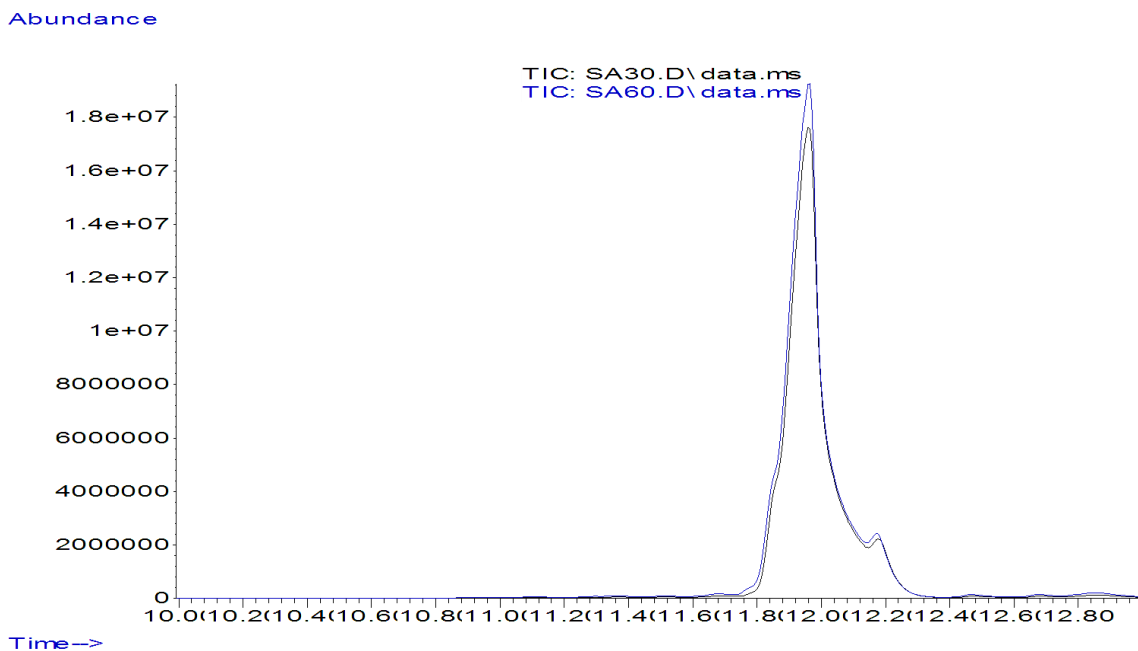


Figura 27. Cromatogramas de AS derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 60 (azul) minutos de reacción.

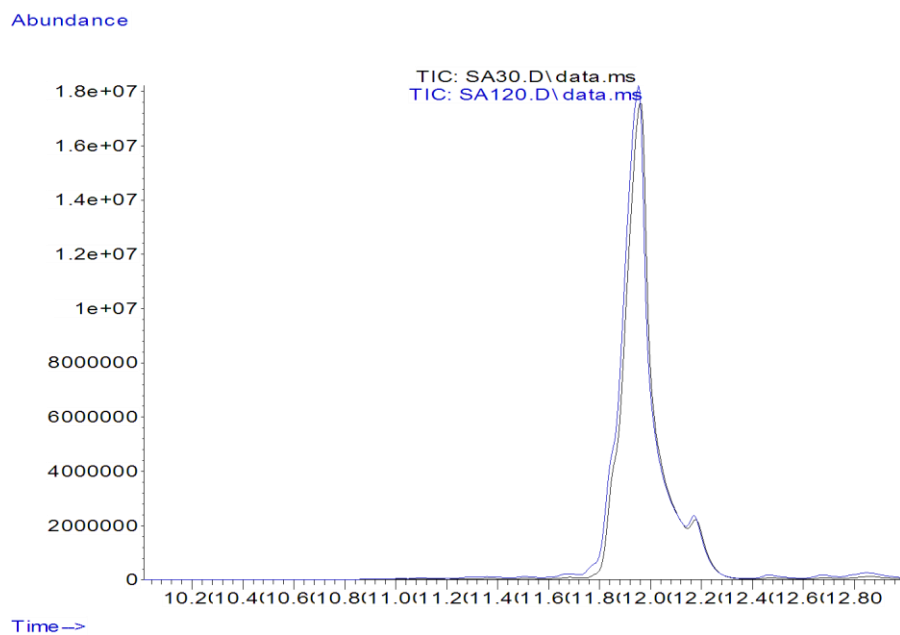


Figura 28. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA con 30 (negro) y 120 (azul) minutos de reacción.

Se observó que una disminución en el producto de reacción cuando se aplican 120°C de temperatura a la reacción (Figura 29).

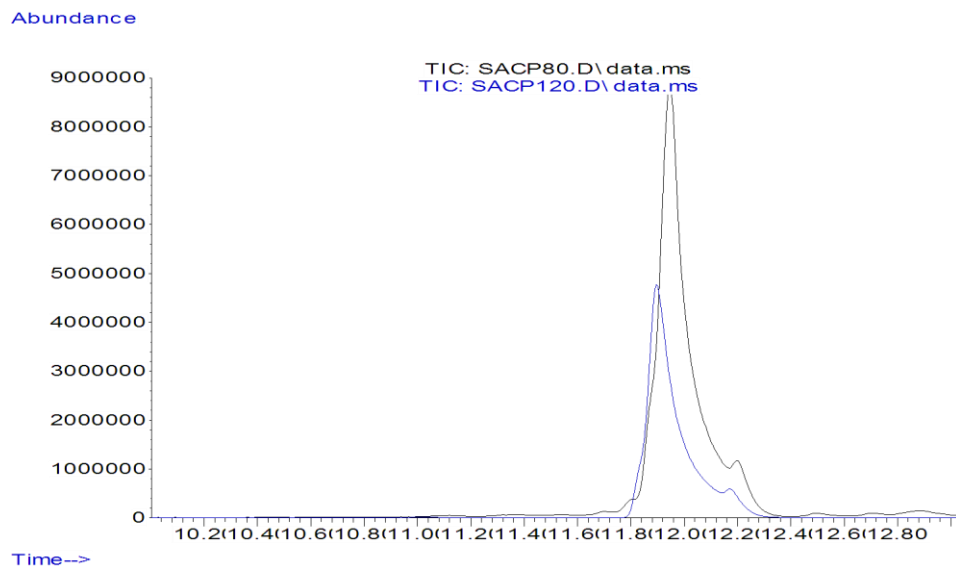


Figura 29. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA a 80°C (negro) y 120°C (azul).

Como se muestra en la figura 30 no hay diferencia entre usar o no piridina, se genera la misma cantidad de producto de reacción (Cromatogramas azul y negro) (Figura 30).

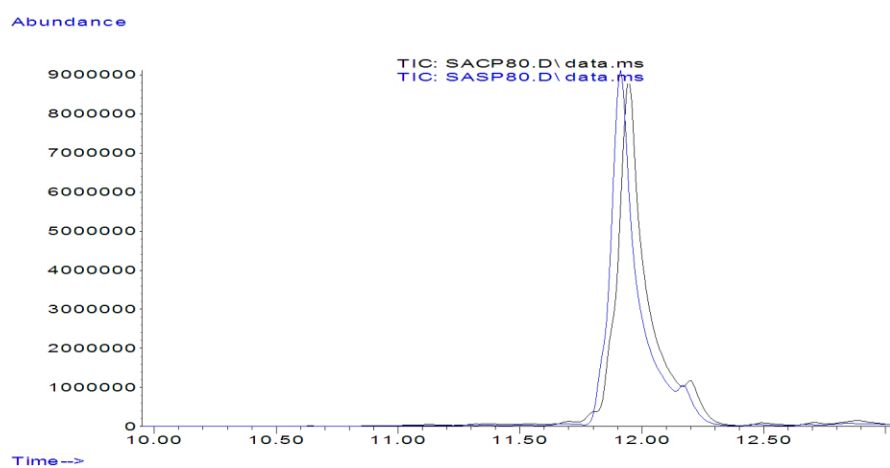
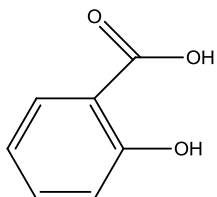


Figura 30. Cromatogramas de SA derivatizado con BSTFA con piridina (negro) y sin piridina (azul).

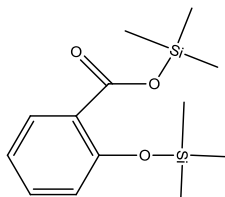
## Comparación entre la derivatización con BSTFA y con PFB

Ácido salicílico



PM=138

Derivatizado con BSTFA

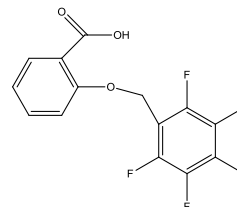


PM=282

Tiempo de retención:

11.7-12.4 minutos

Derivatizado con PFB



PM=318

Tiempo de retención:

17.00-17.87 minutos

La derivatización de SA con BSTFA generó mayor producto de reacción (Cromatograma azul) que la derivatización de SA con PFB, Cromatograma negro (Figura 31). El espectro de masas de SA con PFB (Figura 32) genera los siguientes iones mayoritarios  $m/z$ : 181(100), 120(30), 318(21), 92(8), 121(7). El espectro de SA derivatizado con BSTFA (Figura 33) genera el siguiente patrón de fragmentación  $m/z$ : 267 (100), 73 (42), 268(24), 135 (13), 269 (10).

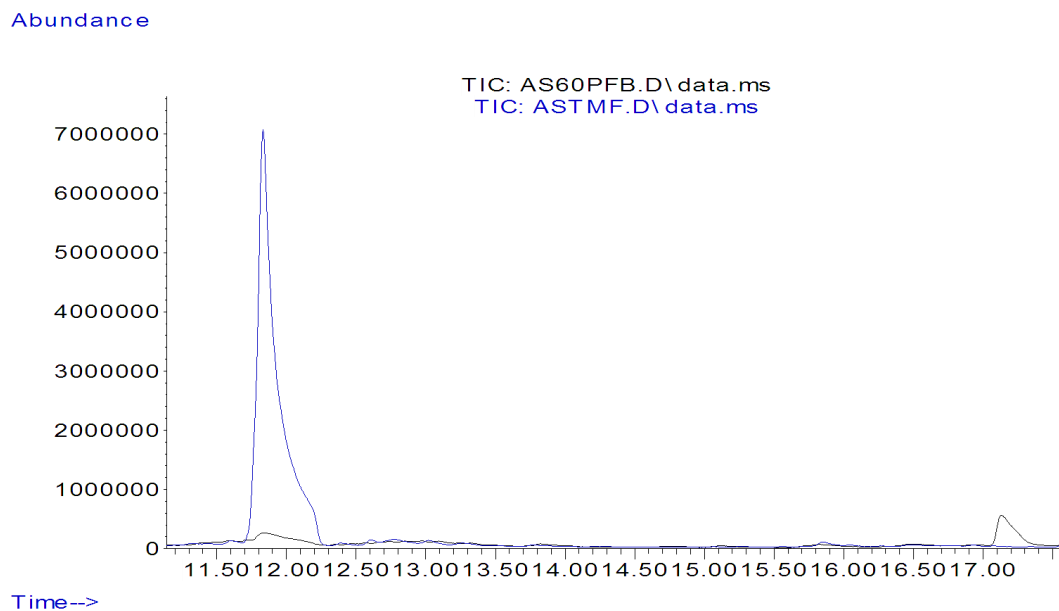


Figura 31. Cromatogramas de SA derivatizado con PFB (negro) y BSTFA (azul).

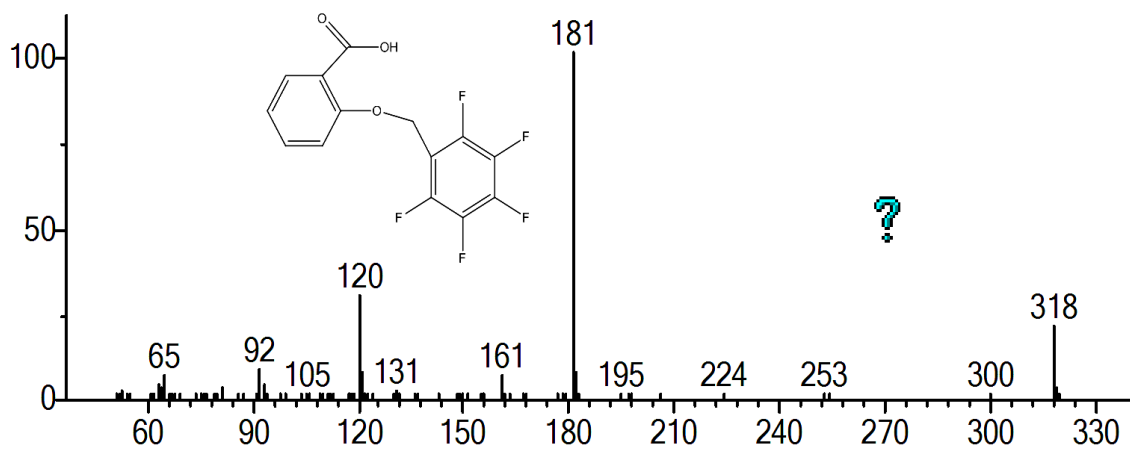


Figura 32. Espectro de masas de SA derivatizado con PFB.

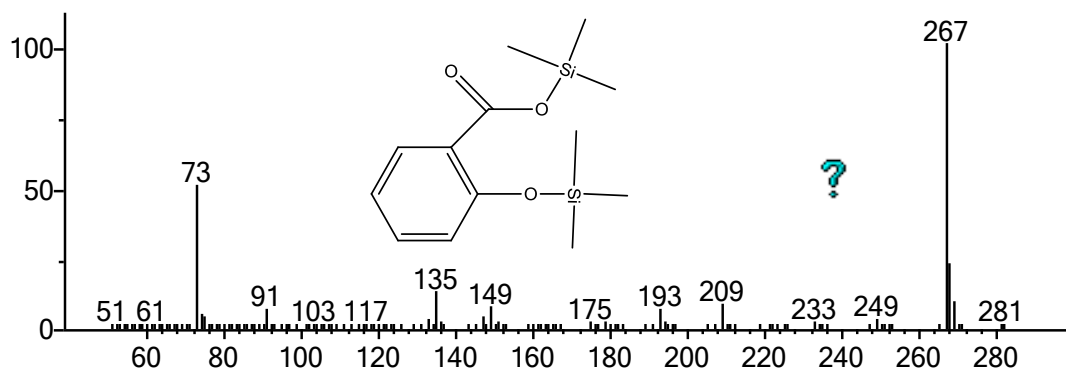
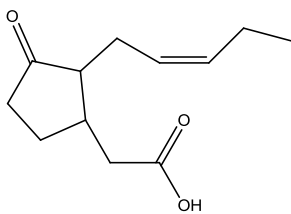


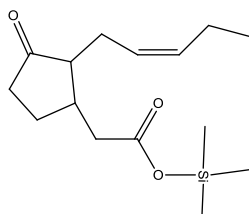
Figura 33. Espectro de masas de SA derivatizado con BSTFA.

Ácido jasmónico



PM=210

Derivatización con BSTFA

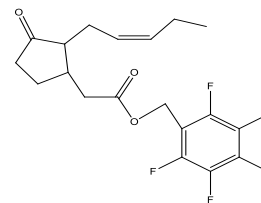


PM=282

Tiempo de retención:

17.47-17.78 minutos

Derivatizado con PFB



PM=390

Tiempo de retención:

26.37-26.7 minutos

La reacción de JA con PFB (Cromatograma azul) genera mayor producto de reacción en comparación con la reacción de JA con BSTFA, pero no hay grandes diferencias (Figura 34).

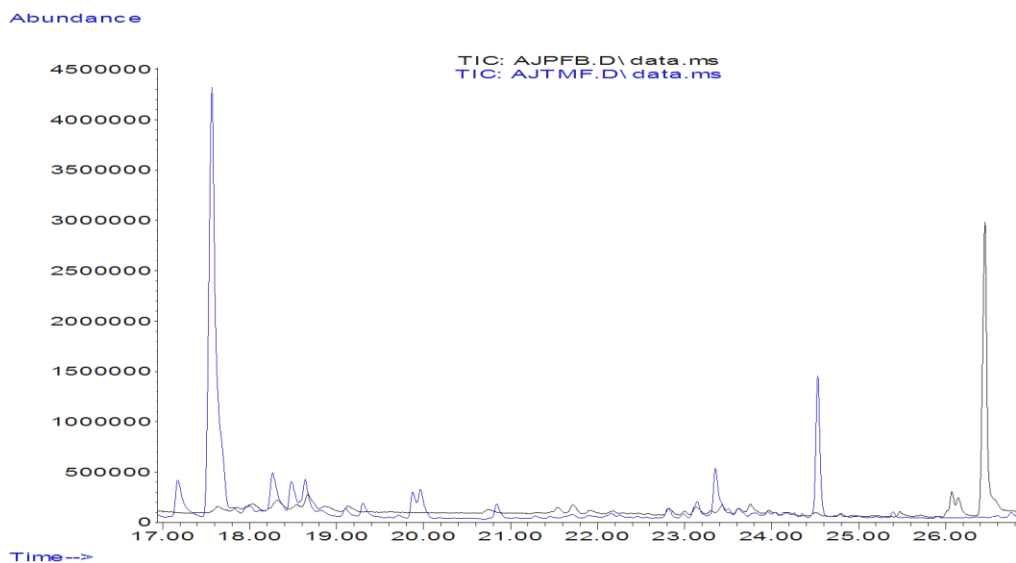


Figura 34. Cromatograma JA derivatizado con PFB (azul) y BSTFA (negro).

El espectro de masas de JA derivatizado con BSTFA (Figura 35) genera el siguiente patrón de fragmentación  $m/z$ : 73(100), 75(83), 117(76), 151(61), 282(50). Y el espectro de masas de JA derivatizado con PFB (Figura 36), genera el siguiente patrón de fragmentación  $m/z$ : 181(100), 141(48), 390(30), 151(26), 83(19)

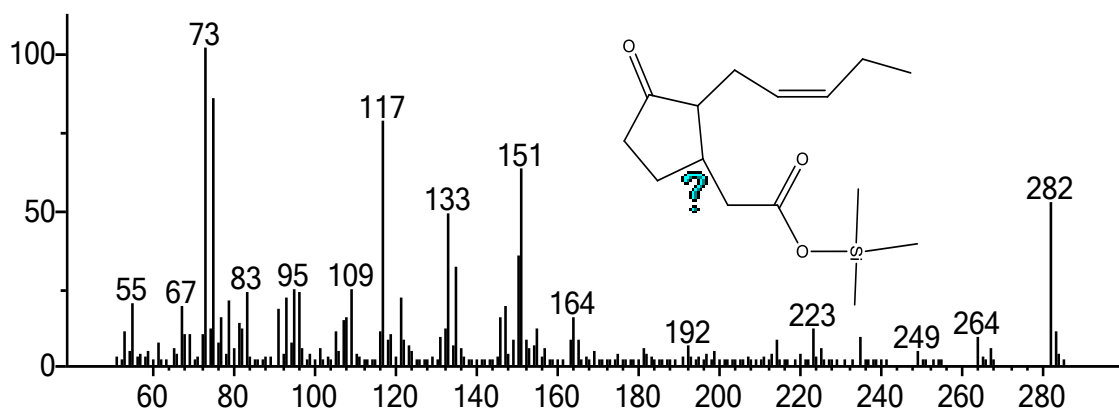


Figura 35. Espectro de masas de JA derivatizado con BSTFA.



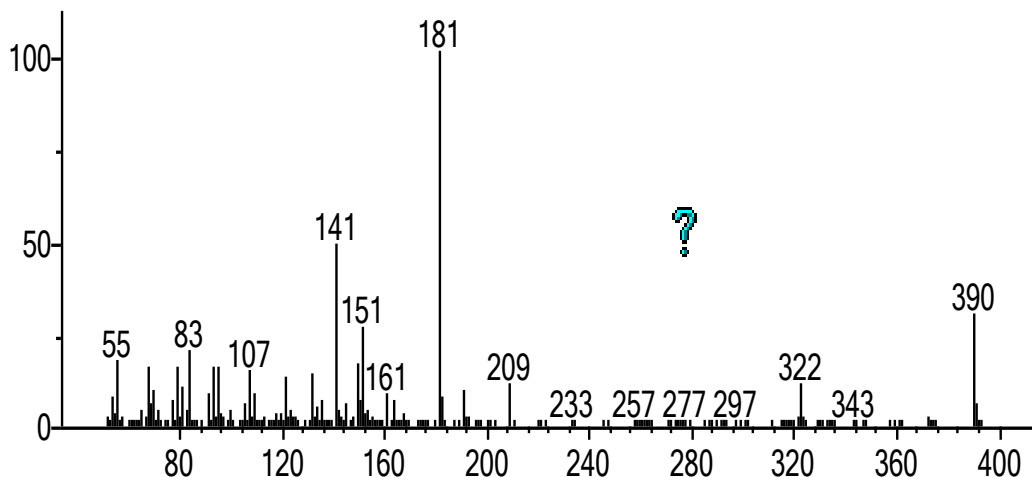
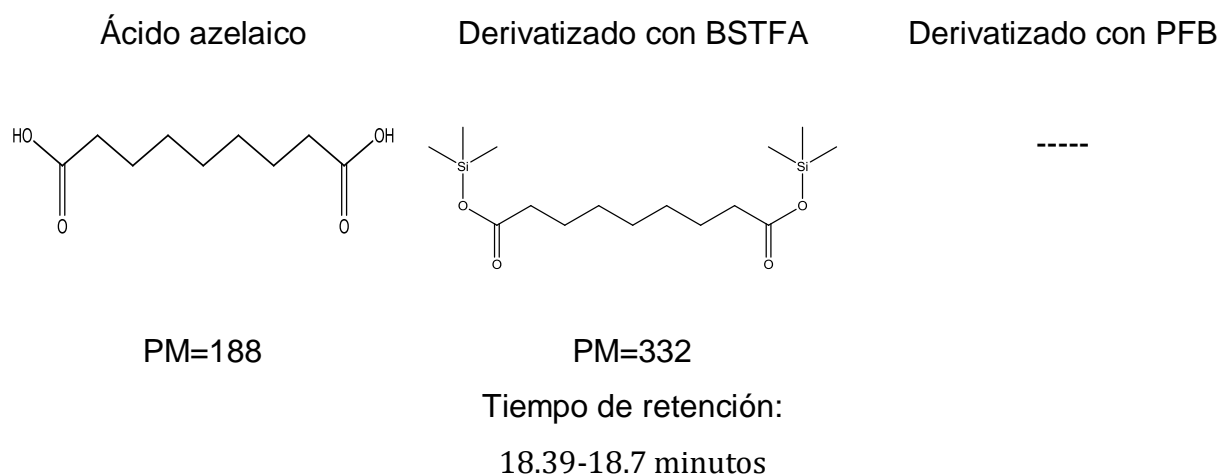


Figura 36. Espectro de masas de JA derivatizado con PFB.



En la reacción de ácido azelaico con BSTFA genera un producto a los 18.5 minutos (Cromatograma azul), no se observa producto de la reacción de ácido azelaico con PFB (Figura 37).

El espectro de masas muestra que a la molécula de ácido azelaico se le incorporan dos grupos trimetilsilil (Figura 38), y el patrón de fragmentación del producto de reacción es el siguiente: 73(99), 75(92), 317(90), 201(51), 129(37).

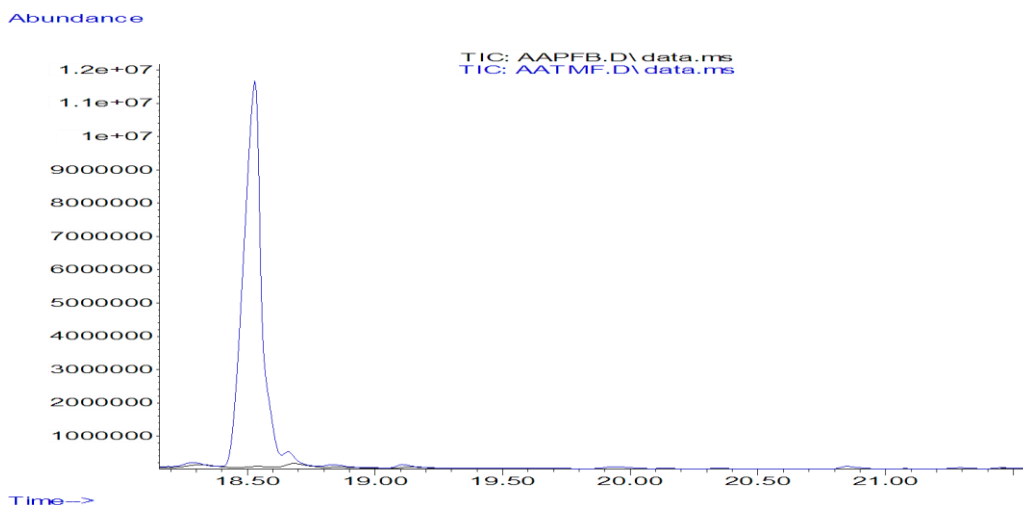


Figura 37. Cromatograma de AA derivatizado con PFB (negro) y con BSTFA (azul).

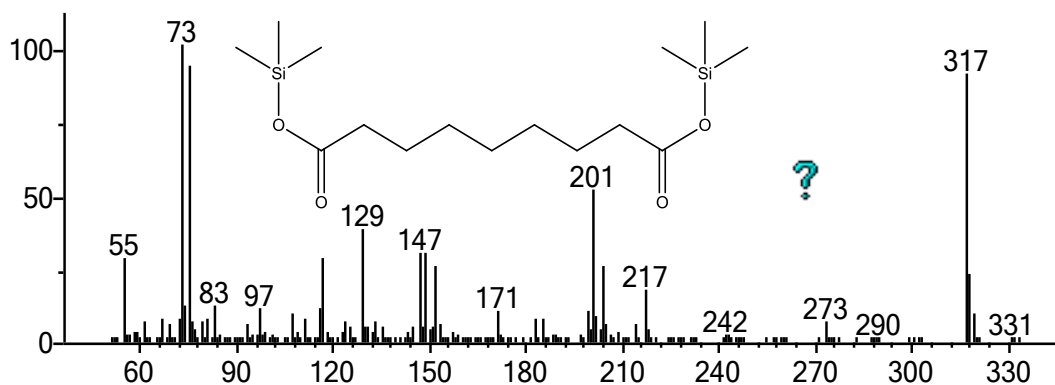
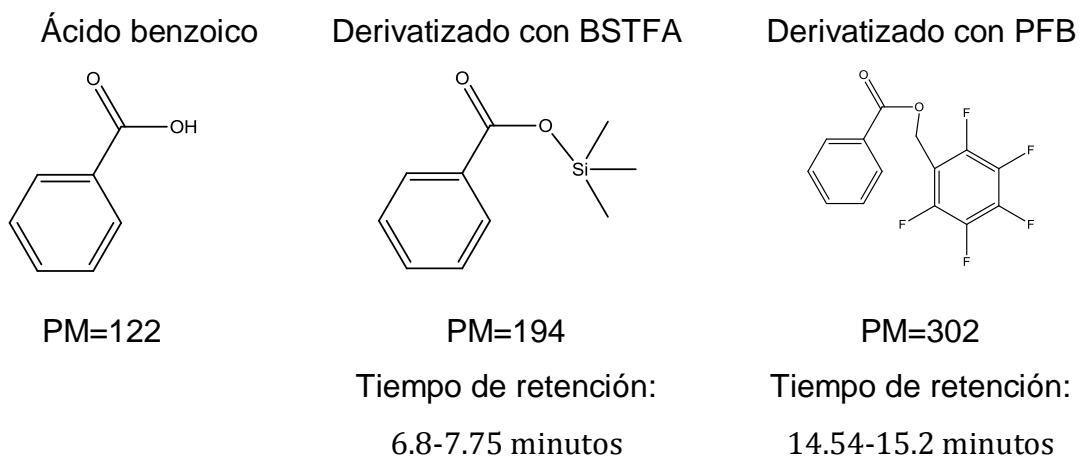


Figura 38. Espectro de masas de ácido azelaico con BSTFA.



Por otra parte ambos productos de reacción del ácido benzoico (AB), tanto con BSTFA (cromatograma azul) como con PFB (cromatograma negro), se produjeron casi en la misma intensidad (Figura 39). El espectro de masas de AB derivatizado con BSTFA (Figura 40) genera el siguiente patrón de fragmentación m/z: 179(100), 105(59), 135(54), 77(41) y 180(14). AB derivatizado con PFB (Figura 41) genera el siguiente patrón de fragmentación m/z: 105(100), 181(92), 77(55), 302(54) y 257(33).

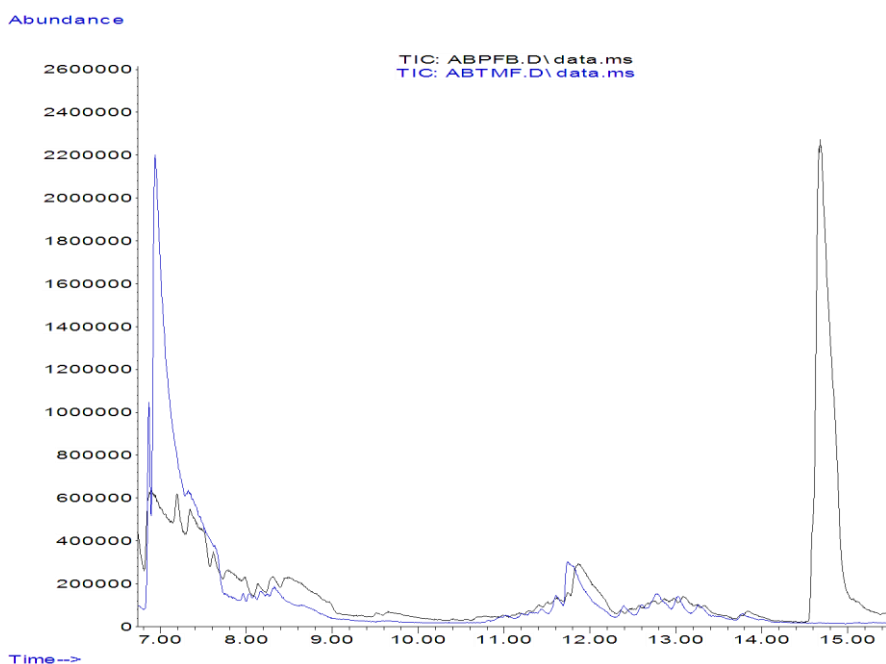


Figura 39. Cromatograma de AB derivatizado con PFB (negro) y BSTFA (azul).

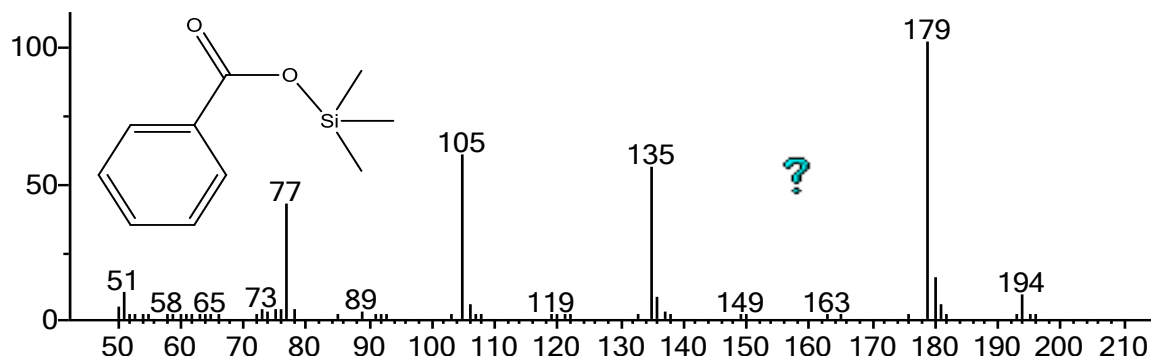


Figura 40. Espectro de masas de AB con BSTFA.

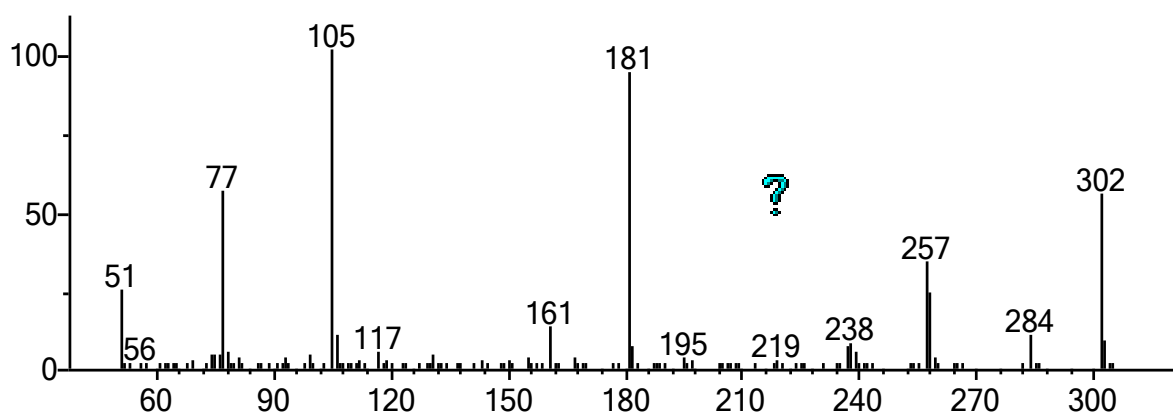
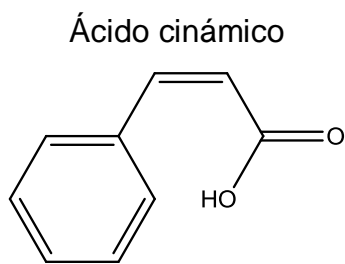
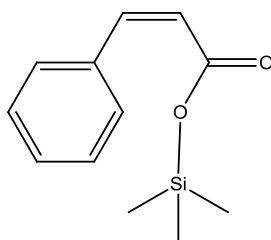


Figura 41. Espectro de masas de AB con PFB.



PM=148

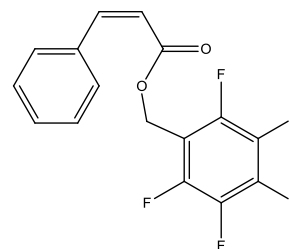
Derivatizado con BSTFA



PM=220

Tiempo de retención:  
12.21-12.72 minutos

Derivatizado con PFB



PM=328

Tiempo de retención:  
21.97-23 minutos

Otro metabolito analizado fue el ácido cinámico (AC). El producto de reacción de ácido cinámico con BSTFA (cromatograma azul) es mayor que el producto de reacción con PFB (cromatograma negro) (Figura 42). Los espectros de masas de AC derivatizado con BSTFA (Figura 43) generaron el siguiente patrón de fragmentación: 205(100), 131(63), 161(61), 103(44) y 77(30). Mientras que AC con PFB (Figura 44) genera el patrón de fragmentación: 181(100), 131(94), 103(90), 283(67) y 328(63).

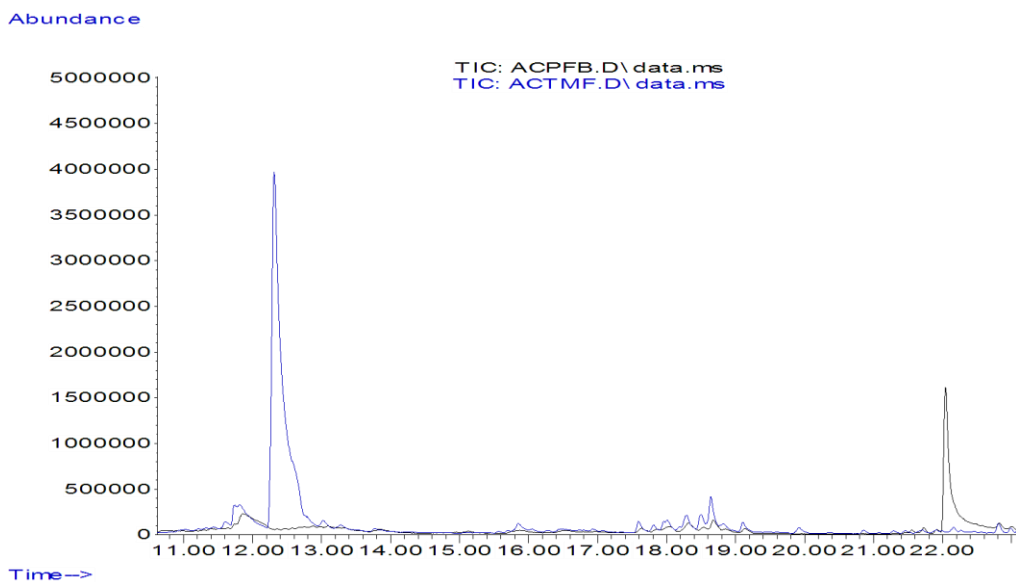


Figura 42. Cromatograma de AC derivatizado con BSTFA (azul) y PFB (negro).

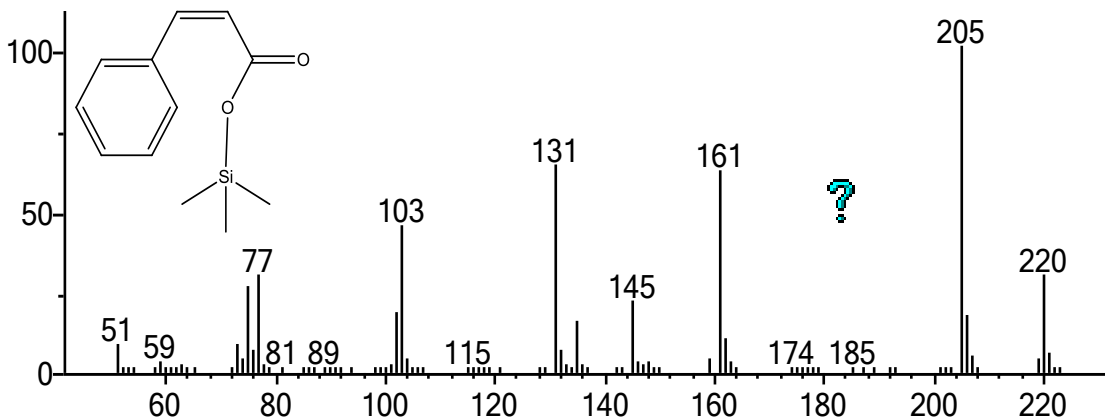


Figura 43. Espectro de masas AC derivatizado con BSTFA.

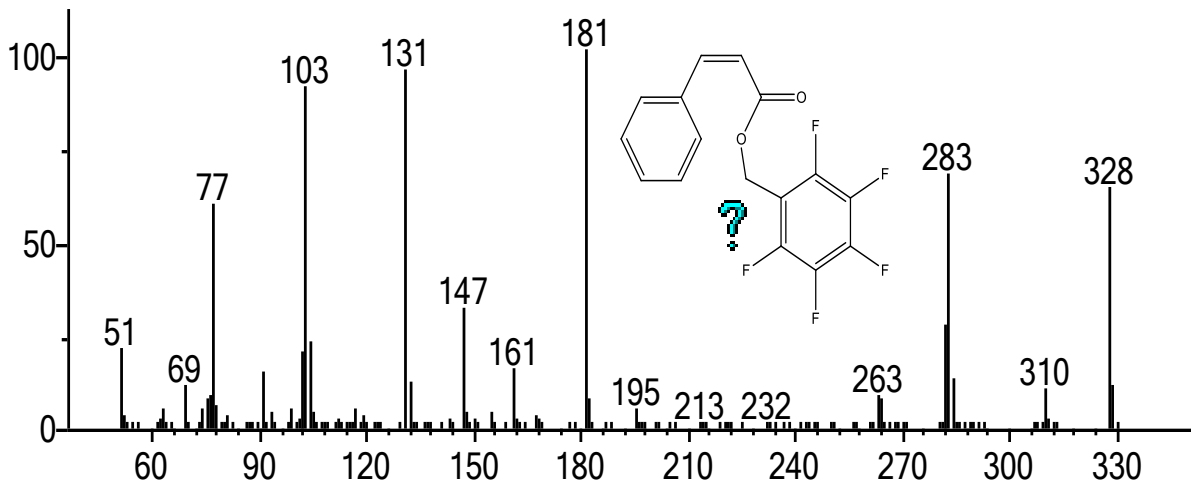
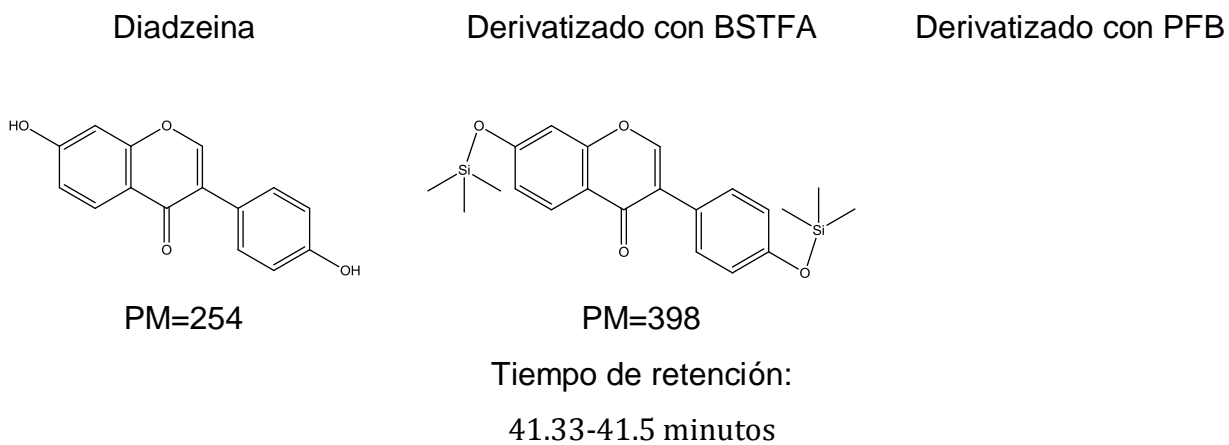


Figura 44. Espectro de masas AC derivatizado con PFB.



A partir de la reacción de diadzeina con BSTFA (Figura 45), se observa que hay un producto de reacción (cromatograma color azul) mientras que la reacción de diadzeina con PFB no se lleva a cabo (cromatograma color negro). El patrón de fragmentación de D derivatizada con BSTFA (Figura 46) es m/z: 398(100), 383(64), 399(32), 384(20) y 73(19).

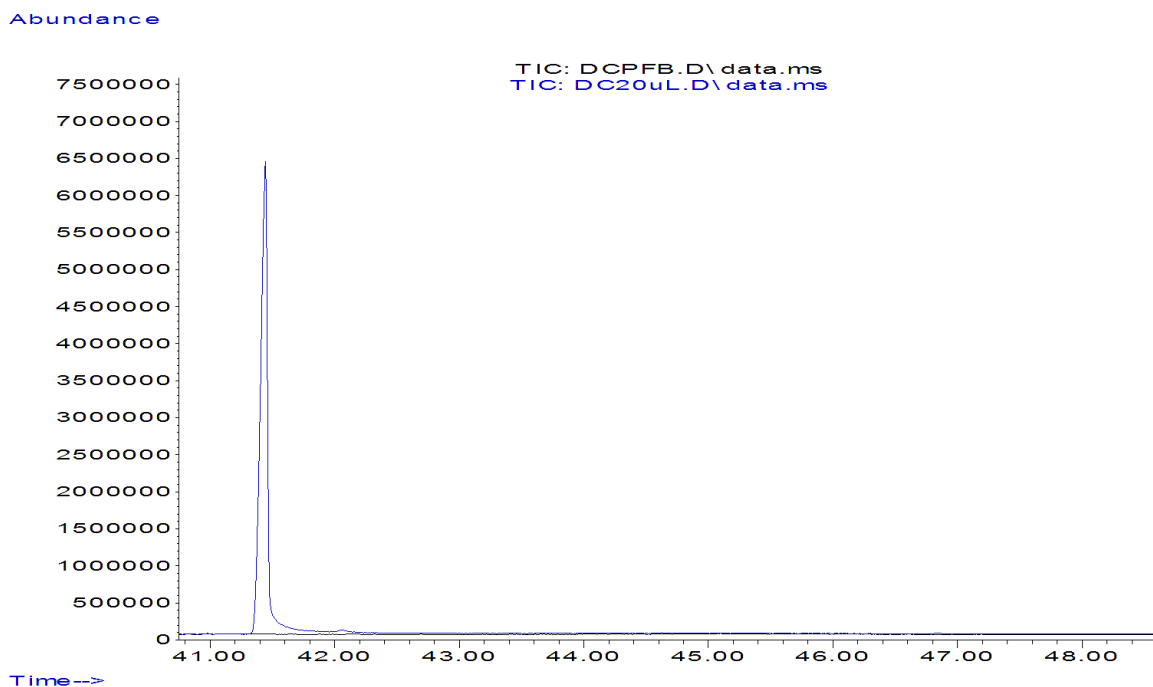


Figura 45. Cromatograma de D con PFB (negro) y con BSTFA(azul).

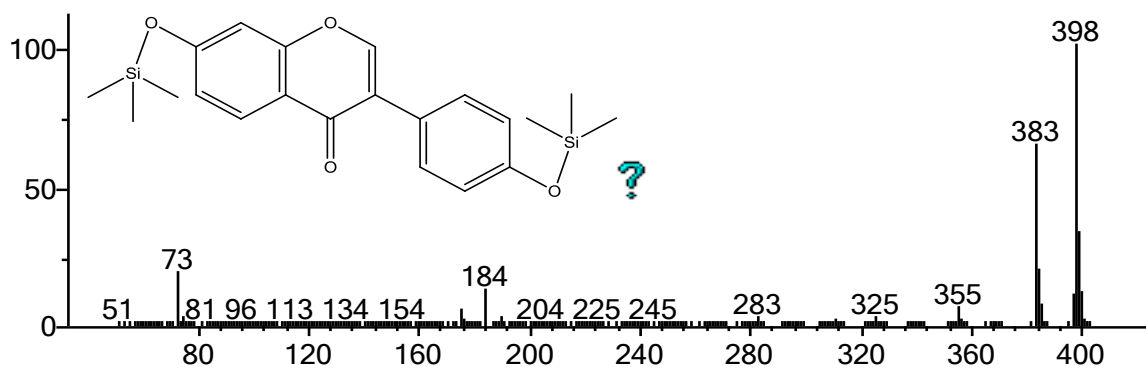


Figura 46. Espectro de masas de D derivatizada con BSTFA.

Por su parte el metil jasmonato (MJ) es un compuesto que no contiene grupos hidróxilo en su estructura, por lo que no necesita derivatizarse para que pueda ser detectado por el GC-EIMS. Contiene un peso molecular de y tiempo de retención de 14.37-15 minutos (Figura 47). El espectro de masas del MJ (Figura 48) genera el siguiente patrón de fragmentación m/z: 83(100), 151(62), 224(49), 95(41) y 79(39).

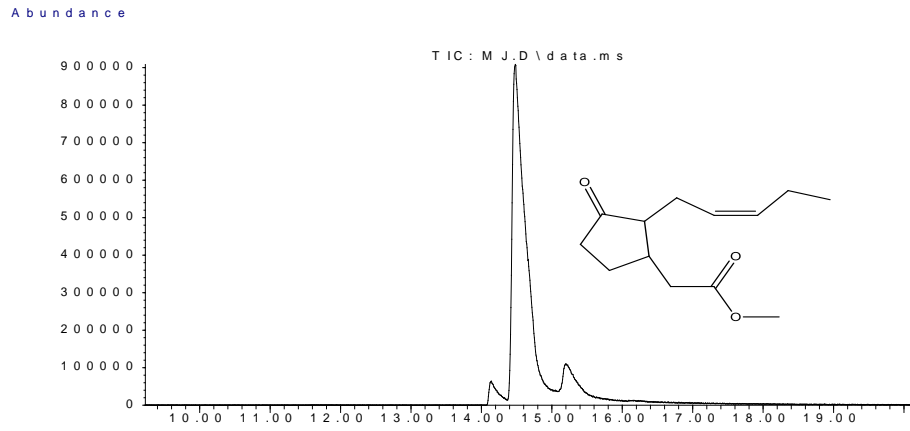


Figura 47. Cromatograma del metil jasmonato.

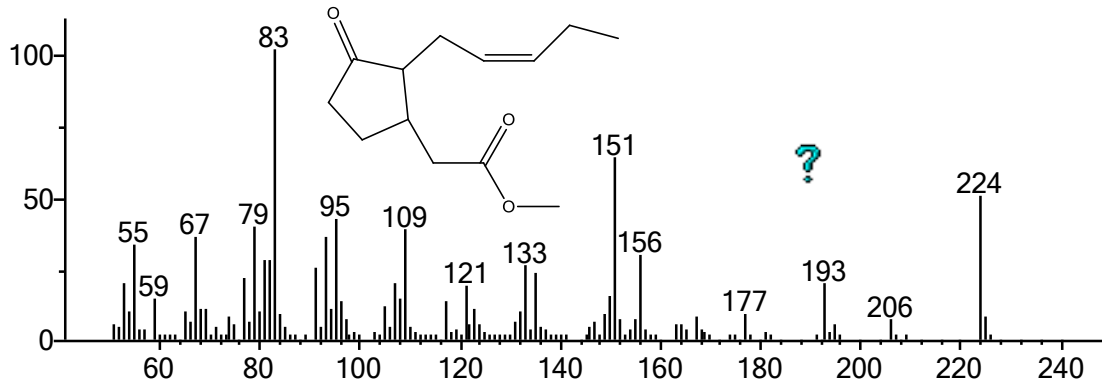
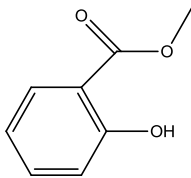


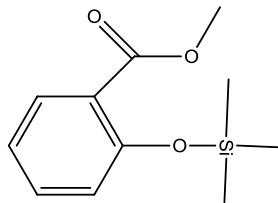
Figura 48. Espectro de masas de MJ.

Metil salicilato



PM=152

Derivatizado con BSTFA



PM=224

Tiempo de retención:

9.27-10 minutos



La reacción de metil salicilato (MS) con PFB no se lleva a cabo, mientras que con BSTFA se observa la generación de un producto (Figura 49). El espectro de masas de MS con BSTFA (Figura 50) genera el siguiente patrón de fragmentación  $m/z$ : 209(100), 179(29), 135(16), 210(16) y 161(14).

Abundance

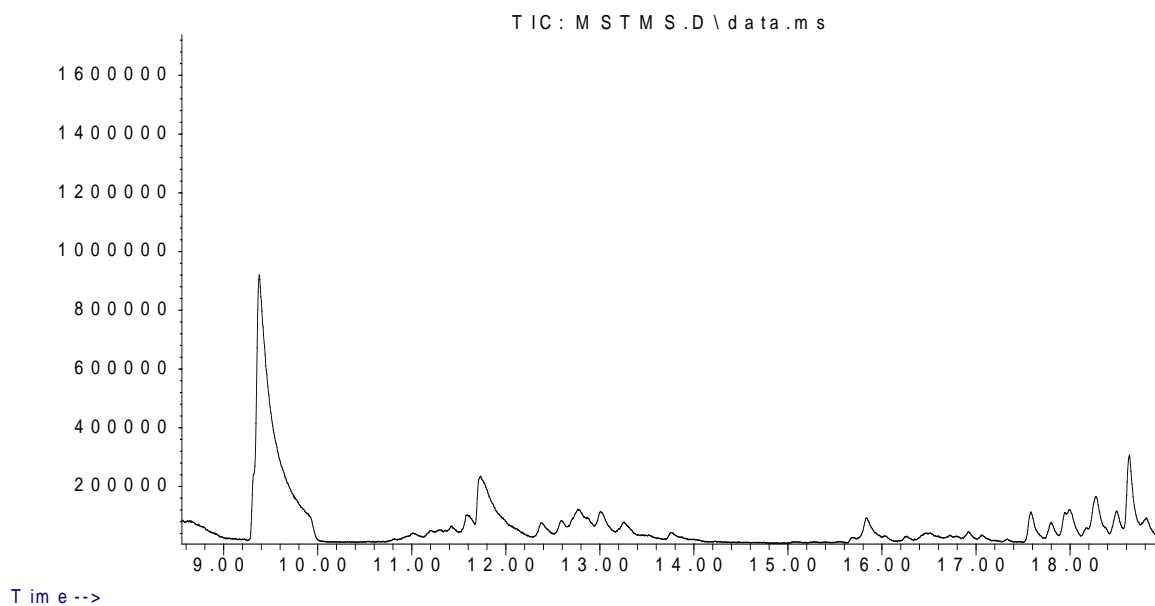


Figura 49. Espectro de masas de MS con BSTFA.

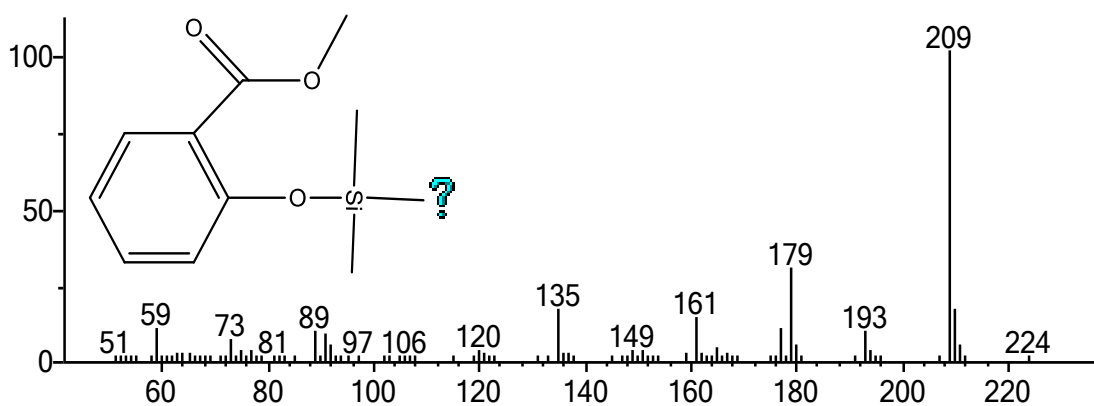


Figura 50. Espectro de masas del MS con BSTFA.

El resumen de la información anterior se muestra en la tabla 11.

<b>Tabla 11. Derivatización de estándares con BSTFA y PFB.</b>					
<b>Estándar</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Derivatización con BSTFA</b>		<b>Derivatización con PFB</b>	
	<b>PM</b>	<b>PM</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>PM</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
<b>AJ</b>	210	182	17.47-17.78	390	26.37-26.7
<b>AS</b>	138	288	11.7-12.4	318	17.00-17.87
<b>AA</b>	138	332	18.39-18.7	368	-
<b>AB</b>	194	302	6.8-7.75	222	14.54-15.2
<b>AC</b>	148	220	12.21-12.72	328	21.97-23
<b>D</b>	254	398	41.33-41.5	-	-
<b>MJ</b>	224	-	14.37-15	-	14.37-15
<b>MS</b>	152	224	9.27-10	-	-

### **Detección de metabolitos en muestra derivatizada con BSTFA y PFB**

El siguiente paso fue el localizar los metabolitos en base a la información obtenida de los estándares. Para ello se derivatiza el extracto de acetato de etilo con BSTFA y PFB. La derivatización con BSTFA (Cromatograma azul) permitió localizar más fácilmente los metabolitos que la derivatización con PFB (Cromatograma en color negro) (Figura 51).

En ambos cromatogramas se realiza la búsqueda de cada uno de los componentes que se analizaron como estándares, pero como metabolitos secundarios. Fue elegido el BSTFA como mejor derivatizante, ya que se logran extraer mayor cantidad de los metabolitos buscados, de esta forma se determinan los iones que caracterizan a cada compuesto (Tabla 12).

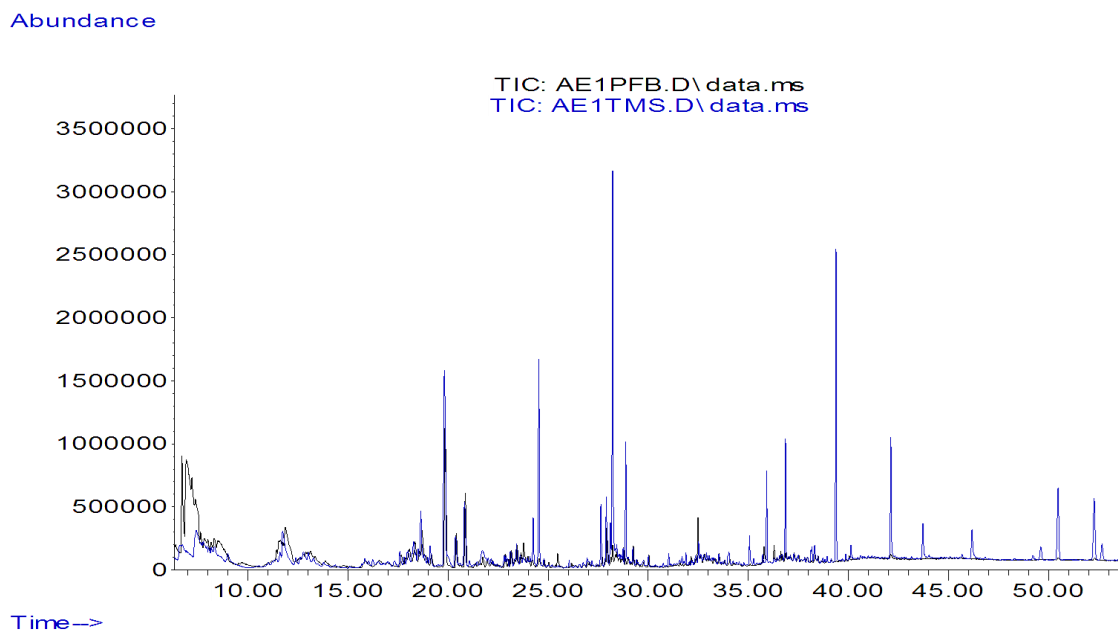


Figura 51. Cromatograma de tejido vegetal derivatizado con BSTFA(azul) y PFB (negro).

Tabla 12. Iones que caracterizan a las moléculas AJ, AS, AA, AB, AC, D, MJ y MS derivatizadas con BSTFA.

Compuesto	Iones m/z	Compuesto	Iones m/z
AJ	117,282,151	AC	205, 131,220,161
AS	267,281,282	D	398,383,184
AA	331,317,201	MJ	224,151,109
AB	179, 105, 194	MS	209,179,224

### **Elección del solvente para extraer los metabolitos de muestra vegetal**

En la Figura 52 se observa que el etanol logra extraer mayor cantidad de compuestos que el acetato de etilo. Sin embargo, el metanol es aún mejor que el etanol para extraer la mayor cantidad de metabolitos (Figura 53).

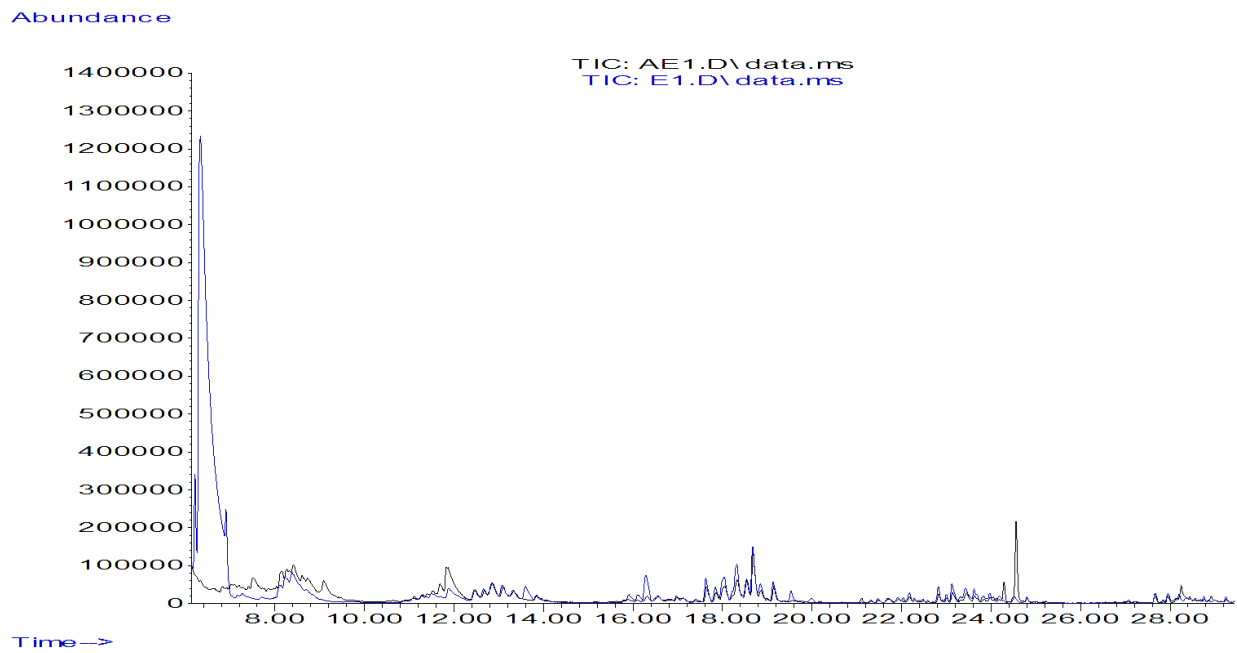


Figura 52. Cromatograma de extractos vegetal con AE (negro) y E (azul).

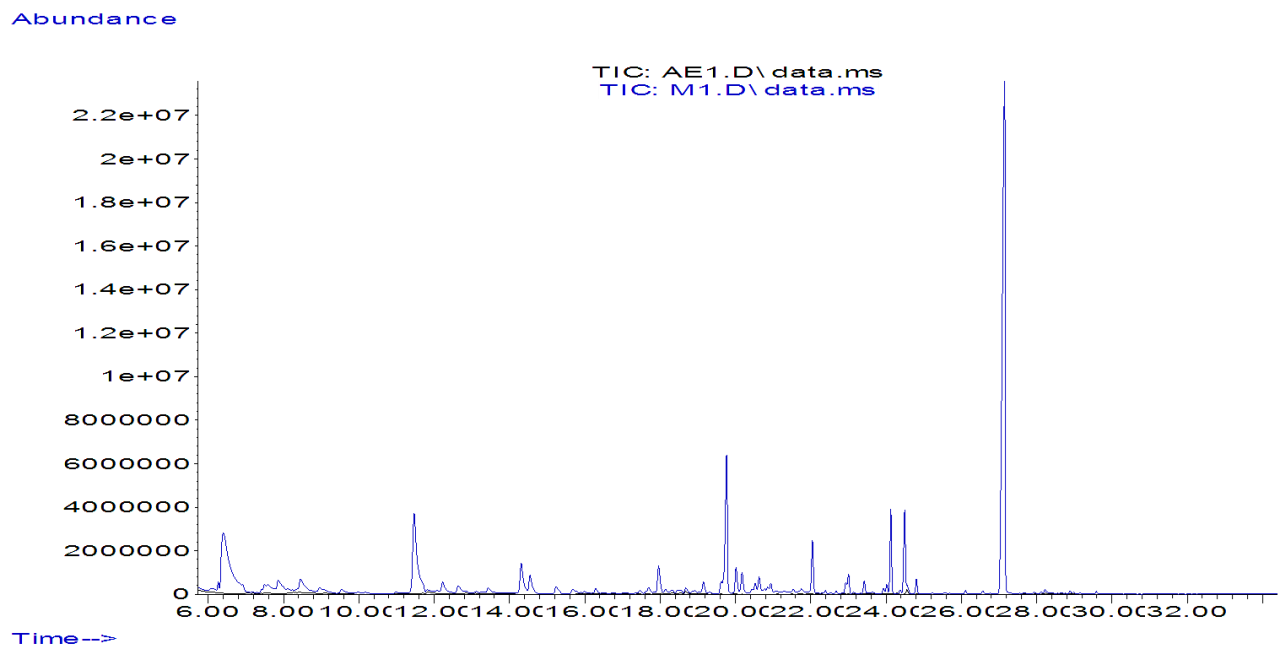


Figura 53. Cromatogramas de extractos vegetales con AE (negro) y M (azul).

A pesar de observarse mejor extracción con metanol, algunos de los metabolitos no se encontraron en ningún extracto, por lo que se volvió a realizar el experimento, pero en esta ocasión fueron añadidos 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares a una concentración de 1  $\text{mg}/\text{mL}$  en la muestra vegetal, se llevó a cabo la derivatización con BSTFA.

Aunque algunos compuestos se observaron más definidos en el extracto etanólico, algunos no se alcanzaron a detectar en el extracto etanólico, ni en el metanólico (Figura 54 y 55). El acetato de etilo mostró una recuperación de una mayor cantidad de estándares. En la Tabla 13 se muestra la comparación entre los extractos, se marca con “+” los compuestos que se detectan, con un “-” los compuestos que se detectan débilmente y se establece aquellos que se encuentran mejor definidos y los que no se detectan.

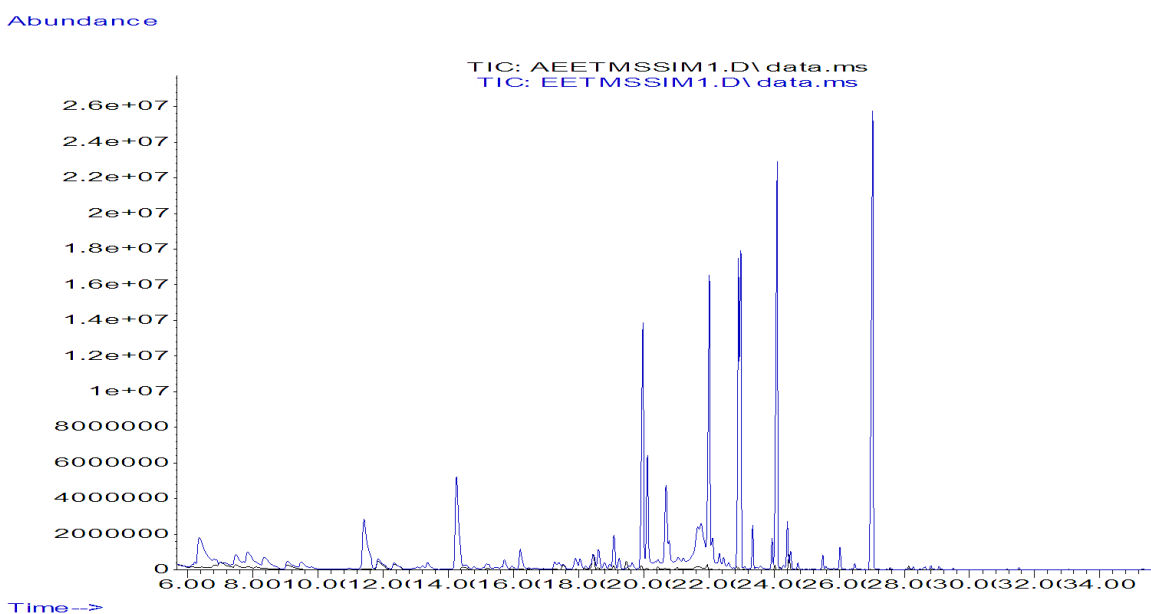


Figura 54. Cromatograma de extracto vegetal con AE (negro) y E (azul) adicionados con 10  $\mu\text{L}$  de estándar interno a 1  $\text{mg}/\text{mL}$ .

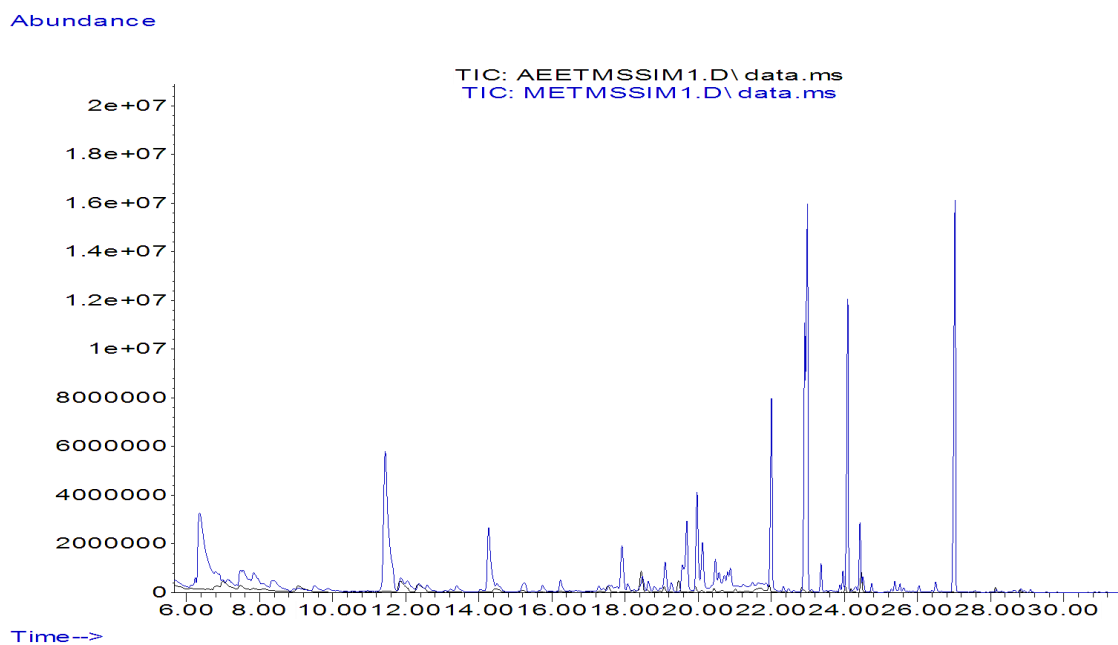


Figura 55. Cromatograma de extracto vegetal con AE (negro) y con M (azul) adicionados con 10  $\mu$ L de estándar interno a 1 mg/mL.

Tabla 13. Comparación entre los extractos metanólico, etanólico y con acetato de etilo.			
	Acetato de etilo	Etanol	Metanol
AJ	Mejor definido	+	+
AS	+	Mejor definido	+
AA	+	+	+
AB	Mejor definido	+	menos definido
AC	+	Mejor definido	-
D	No se observa	No se observa	No se observa
MJ	+	No se observa	No se observa
MS	+	Mejor definido	+

## Curva de calibración

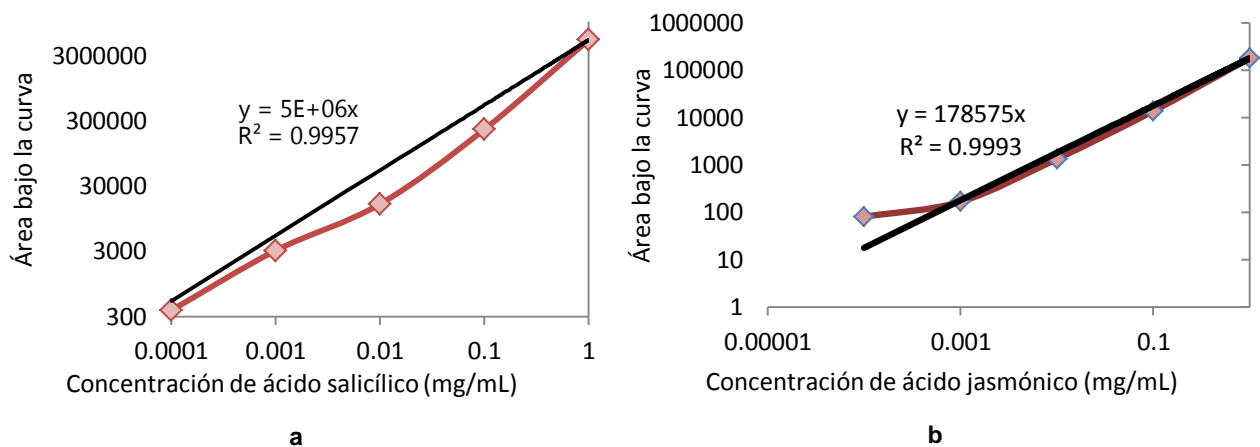


Figura 56. Curva de calibración de a) SA y b) JA.

## Determinación de JA y SA en plantas de frijol con afinina

### Activación con afinina

Dos horas después de la aplicación de la afinina aumenta la producción de SA, y posteriormente se estabiliza. Mientras que el JA se encuentra elevado desde las 2 h y permanece así hasta por 24 h después, después decrecen sus niveles.

Como se puede observar en los gráficos 20 y 21, la afinina es capaz de estimular en las primeras 2 h la vía del SA y mantener activa la vía del JA. El etanol también estimula la vía del SA pero 4 h después, al mismo tiempo que estimula la vía del JA.

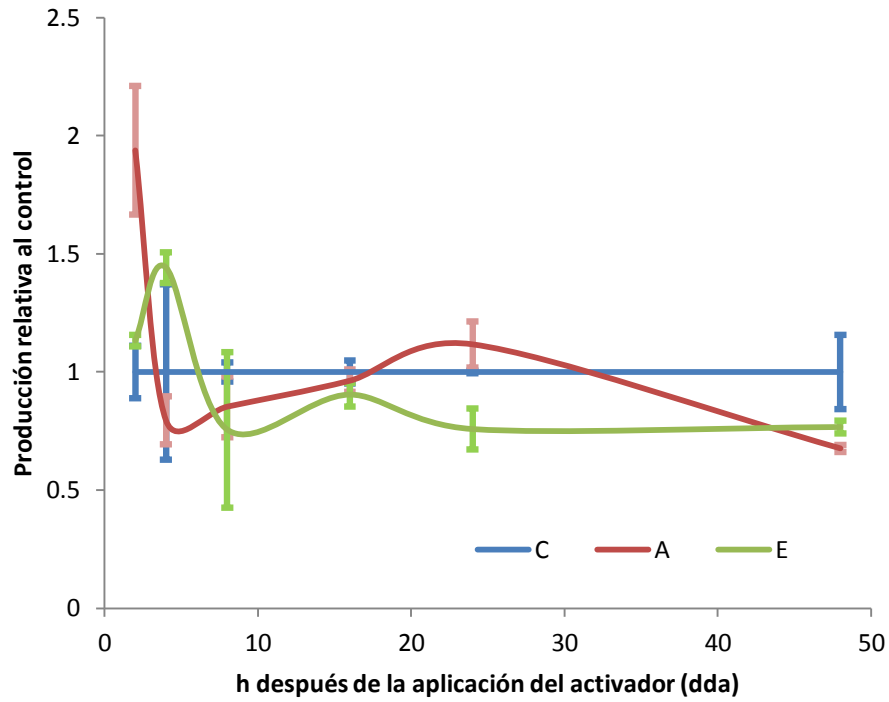


Gráfico 20. Análisis de SA con SIM (267 M/Z) dda.

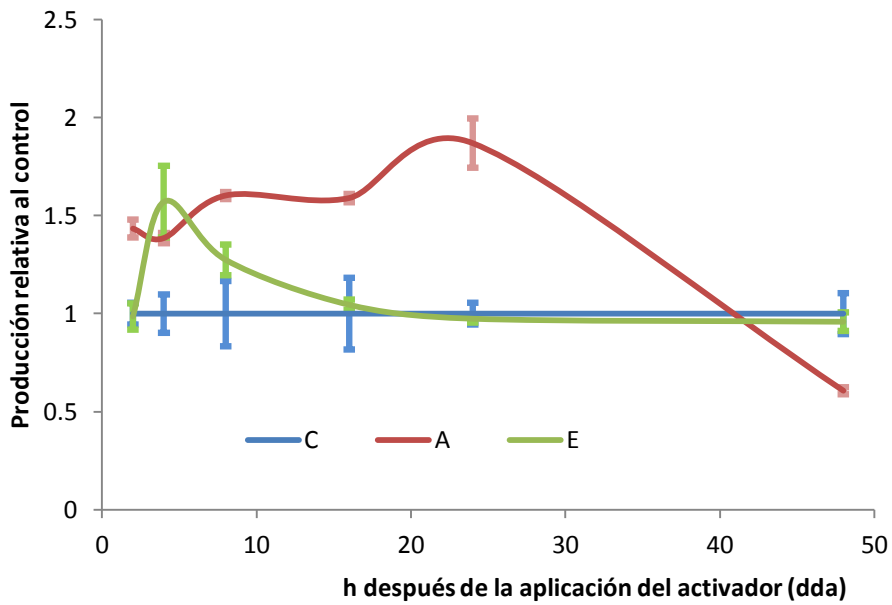


Gráfico 21. Análisis de JA con SIM (151 M/Z) dda.



### **Activación con afinina y patógeno**

Como se aprecia en el Gráfico 20, las plantas infectadas presentan disminución en la producción de SA durante las primeras 16 horas, posteriormente se eleva su producción. Plantas infectadas tratadas con afinina, por el contrario, presentan aumento en la producción de SA las primeras 4 h, posteriormente disminuye y se restablece su producción por encima del control a las 24 h.

El ácido jasmónico parece ser una respuesta generalizada para todos los tratamientos (P, AP y D), todos se encuentran con altas concentraciones en las 2 primeras h, posteriormente disminuyen su producción, el restablecimiento en la producción de JA se realiza más rápidamente en plantas tratadas con afinina a las 8 h. Entre las 4 y las 24 h se observa un antagonismo en las vías de SA y JA para plantas que fueron tratadas con afinina y se encuentran infectadas (Gráfico 21).

La respuesta de SA en plantas tratadas con afinina, ya sea después de la aplicación del activador o después de la infección, es más rápida que en plantas que sólo están infectadas, pero los niveles disminuyen rápidamente, ocurre como un pulso de SA. La respuesta de JA tanto en plantas activadas como en plantas activadas + patógeno (AP) mantuvieron constantes y altos los niveles hasta por 24 h (Gráfico 23). Una excepción a lo dicho anteriormente fue en plantas con AP a las 4 h ddp, donde se observa el pulso de SA (aumento de producción de SA) y una disminución (también en forma de pulso) de JA, un comportamiento antagónico (Gráfico 22-24).

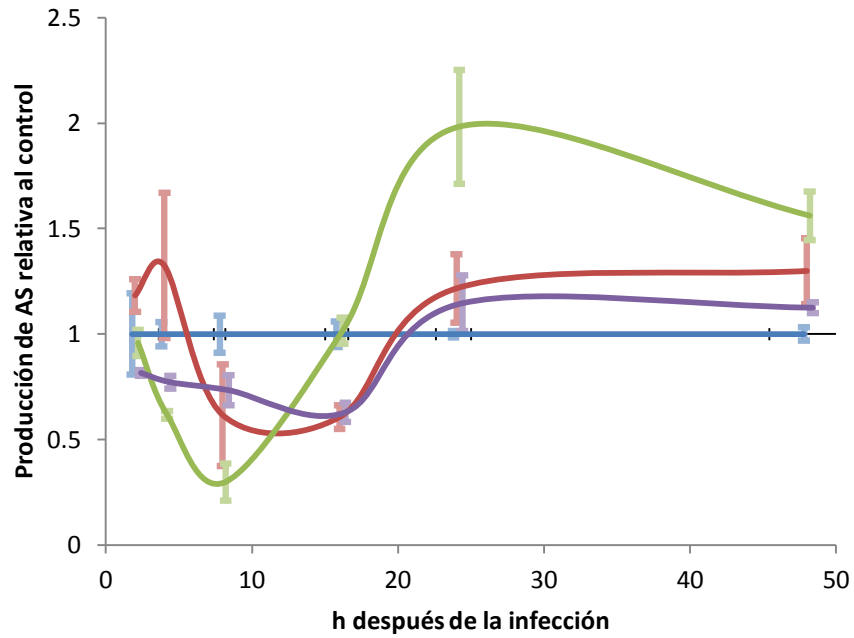


Gráfico 22. Análisis de ácido salicílico con SIM (267 M/Z) ddp.

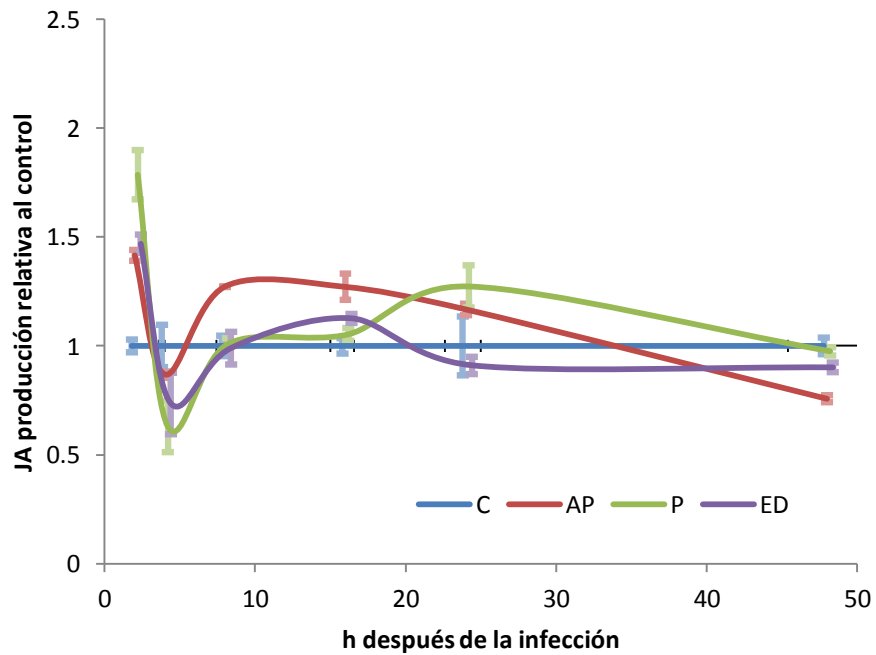


Gráfico 23. Análisis de ácido jasmónico con SIM (151 M/Z) ddp.

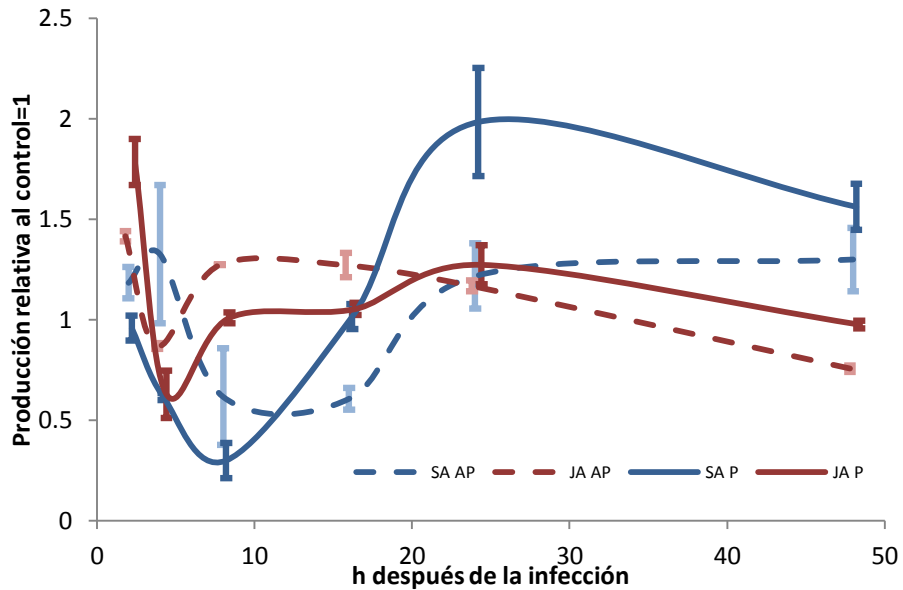


Gráfico 24. Comparación de niveles de AJ y AS en los tratamientos de P y AP.

### Cuantificación de UFC

Se volvió a realizar el análisis de UFC, en esta ocasión se adicionó un control más, la aspersion de etanol 10%+Patógeno, para confirmar que la defensa de las plantas de debe a la afinina y no al etanol (Gráfico 25).

### Análisis de *priming*

Para determinar si existe *priming* a nivel molecular se determinó la expresión del gen *PvPR1* considerado como un marcador de defensa. Como se observa en el Grafico 26, *PvPR1* se encuentra sobreexpresado 2.6 veces en plantas infectadas que fueron asperjadas con afinina previamente, la muestra fue tomada 24 h después de la infección, los niveles de expresión del gen no permanecen altos, sino que decrecen como se observa a los 5 días.

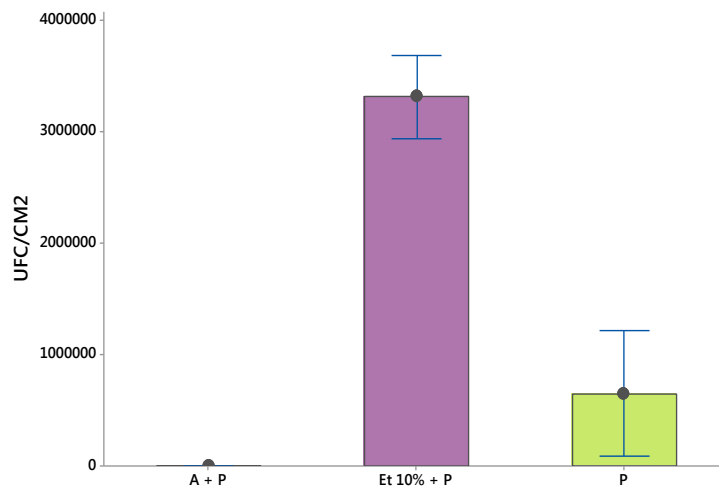


Gráfico 25. Análisis de UFC.

A+P= afinina + patógeno, ET 10% + P= etanol al 10% + patógeno, P= patógeno

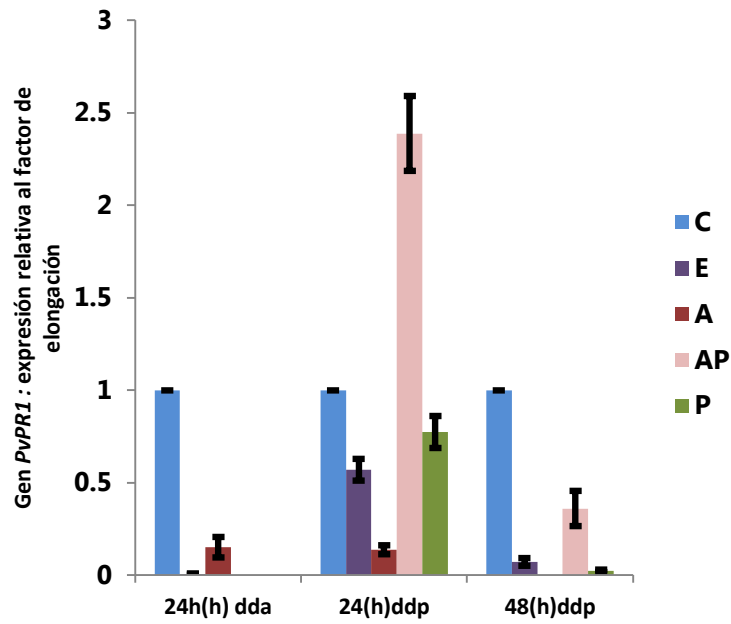


Gráfico 26. Expresión del gen *PvPR1* en hojas en frijol.

dda= después de la activación, ddp= después del patógeno.

## DISCUSIÓN

### cc) *Frijol común variedad Negro Querétaro*

La variedad de frijol Negro Querétaro, es una variedad resistente a la bacteria *P. syringae pv phaseolicola*, ya que la enfermedad Tizón de Halo causada por este patógeno sólo se presentó en 3 de 12 plantas en total, es decir, en el 25 %. De igual forma los síntomas se observaron 21 días después de la infección, aunque ninguna planta infectada y tratada con afinina presentó síntomas, lo cual indica que el tratamiento funcionó. Considerando que la baja susceptibilidad de la variedad causaría confusión en los resultados, se decidió cambiar de variedad a una más susceptible como es la BAT93.

### dd) *Frijol común variedad BAT93*

#### **Semilla y peso seco**

Se observa un aumento en la producción de semilla y peso seco, siempre y cuando se encuentre el patógeno. Lo anterior resulta sorprendente porque *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* disminuye la producción de semilla hasta 40% y disminuye el crecimiento de las plantas, en condiciones favorables para el patógeno, a diferencia de los microorganismos simbiotes, los cuales favorecen la producción y crecimiento de los cultivos (Fucikovsky, 1997). Los procesos de colonización de patógenos y simbiotes benéficos son muy similares, de hecho, siempre hay una continua interacción entre ambos, intercambiando genes horizontalmente (a lo largo de la evolución) y desarrollando relaciones evolutivas específicas con las plantas y el ambiente (Preston, 2004). Por otro lado, *Pseudomonas* es una amplia familia que presenta tanto patógenos como bacterias promotoras del crecimiento y en donde los procesos virulentos que utilizan algunas cepas para infectar son en ocasiones los mismos que utilizan otras cepas para mejorar la defensa en plantas (Preston, 2004). Un ejemplo de estos mecanismos es la activación de SAR, ISR, y el uso del sistema de secreción tipo III (Preston, 2004). Aunque *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* siendo patogénica disminuye la producción de semilla y biomasa, es posible que en ciertas condiciones ambientales promueva la producción de semilla y biomasa. Sin

embargo, el mecanismo no es muy claro aún, puesto que el aumento en semilla y biomasa se observó cuando las plantas fueron tratadas con bacteria + afinina. Tal parece que deben estar estos dos factores: microorganismo y compuesto.

El extracto etanólico proviene de la planta *Heliopsis logipes* en la cual, si bien la alcalamida mayoritaria (más del 90%) es la afinina, se han encontrado hasta el momento otras 7 estructuras con el grupo amido, así como un caldo de otros componentes polares (García *et al.*, 2004). Los resultados anteriores sugieren que hay otro(s) componente(s) adicionales a la afinina, con capacidad para aumentar la producción de semilla y peso seco (en presencia de patógeno). Tales componentes podrían ser las alcalamidas, ya que son consideradas como fitohormonas moduladoras en la expresión o represión de fitohormonas (Molina-Torres *et al.* (Martinez-Medina, y otros, 2016)., 2004).

Las fitohormonas relacionadas con el desarrollo comprometen las vías de defensa cuando las plantas se encuentran estresadas. Algunos patógenos producen hormonas como las citoquininas que promueven la virulencia a través de la inhibición de la HR, retardando la senescencia en el área infectada (Jones y Dangl, 2006). Se ha reportado también que ocurre represión de auxinas como un mecanismo defensa en plantas a través de la vía del ácido abscísico (Jones y Dangl, 2006).

### **Mejor tratamiento**

Hasta el momento se tenía la noción de que el mejor tratamiento era la aplicación de activador a 600  $\mu M$ , siendo el extracto mejor que la afinina pura y el riego la mejor forma de aplicación. Por lo que se realizaron análisis del gen *PvPR1* y de ácido jasmónico en los tratamientos con afinina y extracto a 600  $\mu M$  de forma regada.

### **Gen *PvPR1***

Plantas tratadas con afinina, mostraron un aumento de 10 veces la expresión del gen *PvPR1* 24 h después de la activación. Este aumento coincide con los resultados mostrados por Méndez-Bravo en 2011, donde plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a *N*-isobutil decanamida un análogo a la afinina, tienen el gen *PR1* sobreexpresado 7.5 veces (Méndez-Bavo *et al.*, 2011). Mientras que plantas infectadas con la bacteria y tratadas previamente con afinina, mostraron disminución del gen

*PvPR1* 24 y 120 h después de la infección. *PR1* es un marcador de la vía del ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana*, su expresión se eleva frente a patógenos biótrofos, hemibiótrofos y análogos al ácido salicílico (Zhang *et al.*, 2010). Las vías del ácido salicílico y la del ácido jasmónico son en ocasiones y en algunas especies, antagónicas (Van del Does *et al.*, 2013). Por lo anterior, consideramos que posiblemente, la represión del gen *PvPR1* en *Phaseolus vulgaris* era causada porque la vía de JA se encontraba activa.

### **Ácido jasmónico**

Efectivamente las plantas infectadas por la bacteria *P. syringae* tratadas previamente con afinina (aplicada por riego), mostraron un aumento en la producción de JA que se mantuvo hasta los 5 días después de la infección. La afinina por sí sola no fue capaz de inducir la producción de JA, contrario a lo que Méndez Bravo y colaboradores encontraron, que la *N*-isobutil decanamida si activa la producción de JA.

Por otro lado, fue interesante encontrar que los niveles de ácido jasmónico en plantas control (sin activador ni patógeno) aumentaron después de la aplicación de la bacteria (el patógeno no fue aplicado a las plantas control; los tratamientos fueron colocados cercanos unos de otros). Es posible que las plantas infectadas produjeran volátiles que fueron detectados por plantas control.

### **ee) Cinética de crecimiento de *P. syringae***

En un sistema complejo donde participan el ambiente, el hospedero y el patógeno, es complicado determinar la serie de pasos que sigue un fenómeno y las interacciones que se realizan. La afinina ha presentado actividad bactericida y fungicida contra algunas cepas, y los resultados obtenidos en este estudio muestran que la afinina inhibe el crecimiento de *P. syringae* pv *phaseolicola* sin matarla, a 600 y 1200  $\mu\text{M}$ .

### **ff) UFC**

En plantas de frijol, la aplicación de afinina por aspersion a 600  $\mu\text{M}$  evitó la propagación de la bacteria. El proceso que se llevó a cabo consistió en aplicar la afinina y una semana después inocular la bacteria virulenta. Mientras que plantas que fueron

regadas con afinina no mostraron resistencia contra el patógeno; tal parece que la respuesta de defensa es diferente si la afinina es asperjada o regada.

Pero, ¿qué sucedería si la afinina no se aplica antes de la infección, sino justo unas horas después? La aplicación de la afinina y el extracto de forma asperjada a 60  $\mu M$  y 600  $\mu M$  elevaron drásticamente la infección en las plantas. Un fenómeno similar fue reportado por Adame-Álvarez y colaboradores en 2014, en los cuales estudiaron el efecto que tiene la inoculación de hongos endófitos antes, durante y después de la inoculación de patógeno en plantas. Ellos observaron que la inoculación de hongos endófitos, lo cuales activan la vía de JA, le confieren a la planta capacidad para defenderse contra patógenos biótrosos, siempre y cuando la inoculación del hongo se realice antes que la del patógeno. Si la inoculación del hongo se realiza después de la infección del patógeno, éste último prolifera y se desarrolla la enfermedad con más facilidad (Adame-Álvarez *et al.*, 2014).

### **gg) Determinación de AJ y AS**

Se eligieron las condiciones en la que afinina mejora la defensa de las plantas. Estas fueron las siguientes.

- Activador: Afinina.
- Aplicación: Asperjado.
- Concentración: 600  $\mu M$ .
- Tiempo: antes del patógeno.

En este estudio se encontró que la afinina en forma regada o asperjada, mantiene niveles altos de JA, Méndez-Bravo y colaboradores encontraron que su análogo *N*-isobutil decanamida también aumenta los niveles de JA y la respuesta sistémica que produce esta vía, protege a la planta contra el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Méndez-Bavo *et al.*, 2011). Aunque la afinina no es un análogo al ácido jasmónico, si tiene una cadena acilo como los lípidos y ácidos grasos que se encuentran abundantes en la superficie de la membrana celular, lugar donde se lleva a cabo la comunicación intercelular. Cambios en los niveles endógenos de los ácidos grasos regulan la expresión de genes de diversas vías. Su aplicación exógena como del ácido hexanóico



y el ácido araquidónico lograron proteger contra *Botrytis cinerea* al tiempo que aumentaba la producción de JA-Ile (Aranega-Bou *et al.*, 2014) (Méndez-Bavo *et al.*, 2011).

Este antagonismo en la defensa, lleva a pensar que la afinina la cual induce el JA no le conferiría resistencia contra *P. syringae* que es una bacteria hemibiótrofa así como tampoco activaría la expresión del gen *PvPR1*. Sin embargo, la afinina asperjada logró evitar la propagación de la bacteria y afinina regada aumentó la expresión del gen *PvPR1* hasta 10 veces mientras que plantas con patógeno+afinina asperjada lo aumentaron 2.6 veces. Estudios recientes han mostrado que, si bien el antagonismo entre vías de defensa es correcto, depende de las condiciones. Fu y Do en 2013 encontraron que la aplicación de JA y SA en bajas concentraciones llevaron a la expresión conjunta del gen *PR1* marcador de SA y *PDF1.1* marcador de JA, mientras que la aplicación en altas concentraciones de JA y SA llevan a un antagonismo de vías y expresión de genes (Fu y Dong, 2013). Truman y colaboradores en 2007 así como Attaran y colaboradores en 2009, propusieron que a diferencia del antagonismo, ambas vías podían inducirse sinérgicamente para conferir resistencia, en sus investigaciones encontraron que la infección con *Pseudomonas syringae pv tomato* aumentó los niveles de JA a las 6 h ddp disminuyendo a sus niveles normales a las 11h ddp, también encontraron que la aplicación exógena de JA indujo la SAR y que algunas mutaciones en la vía de JA disminuyeron la defensa por SAR (Truman *et al.*, 2007) (Attaran *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

- Afinina por riego no activa el *priming* del gen *PvPR1*.
- Afinina asperjada activa el *priming* y aumenta la expresión del gen *PR1* hasta 2.3 veces.
- Afinina y extracto, asperjados a 600  $\mu\text{M}$ , inhiben y disminuyen, respectivamente, la propagación de *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*, en frijol.
- Afinina y extracto asperjado después del patógeno, aumentan hasta 10 veces la concentración de bacteria en la planta.
- La concentración con mejores resultados para la defensa y primado fue de 600  $\mu\text{M}$ .
- El extracto tiene un efecto positivo en la producción de semilla.
- La afinina asperjada aumentan la producción de biomasa en frijol.
- El etanol al 10% tanto regado como asperjado, disminuye drásticamente la producción de semilla por planta de frijol.
- La derivatización con BSTFA si permite la identificación de varios metabolitos secundarios, específicamente SA y JA.
- Afinina asperjada o regada induce tanto la vía del JA como la del SA.
- La fitohormona de JA participa en la generación de defensa y posiblemente el primado de *Phaseolus vulgaris* contra la fitohormona hemibiótrofa *Pseudomonas syringae*.

## PERSPECTIVAS

Los resultados anteriores no resuelven las incógnitas sobre la defensa de plantas, al contrario, dejan al descubierto que aún falta mucho por estudiar y se han generado más dudas al respecto. Siendo este el primer estudio realizado para analizar la activación de *priming* utilizando alcaloides, se proponen los siguientes estudios como segundo paso de esta investigación.

- Cinética de crecimiento de patógeno sobre placa y matraz con afinina 600  $\mu M$ .
- Análisis de metabolitos con al menos 5 réplicas biológicas.
- Determinar si el gen *PvPR1* permanece primado en las siguientes generaciones.
- Analizar otros genes involucrados en la defensa como los relacionados con el JA y ET.
- Analizar si la afinina activa el *priming* y ayuda en la defensa contra patógenos necrotróficos.
- Estudiar la generación de volátiles y el posible *priming* o resistencia sistémica que pueda generar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. San Diego, California, USA: Academic Press.
- Aranega-Bou, P., Leyva, M., Finiti, I., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2014). *Priming* of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in Science*, 193-231.
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, H. C., & Mansfield, J. W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant Pathol.* , 617-627.
- Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2015). The "prime-ome": towards a holistic approach to *priming* . *Trends in Plant Science*, 443-452.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 381-395.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 379-406.
- Bradshaw, A. D. (1972). Some of the evolutionary consequences of being a plant. *Evolutionary Biology*, 5, 25-44.
- Chester, K. S. (1930). The problem of acquired physiological immunity in plants . *Q Rev Biol*, 275-324.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.*, 289-297.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defense *priming* . *Trends Plant Sci*, 524-531.
- Conrath, U., Pieterse, M. J., & Mauch-Mani, B. (2002). *Priming* in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 210-216.

- DGIEA-MAG. (1991). *Aspectos Técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica*. . San José, Costa Rica: Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M. A., Saindrenan, P., Fritig, B., & Kauffman, S. (1997). Spatial Aand temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in Tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 646-655.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance . *Annu. Rev. Phytopathol.*, 185-209.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology*, 275-296.
- Fraire-Velázquez, S., & Rodríguez-Guerra, R. (2011). *Abiotic stress response in plants-physiological, biochemical and genetic perspectives*. (A. Kumar, & B. Venkateswarlu, Edits.) Rijeka, Croacia: InTech.
- Francl, L. J. (2001). The disease triangle-plant pathological paradigm revisited. *The Plant Health Instructor*.
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., & De Morales, C. M. (2008). *Plant Physiology*, 818-824.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 839-863.
- Fucikovsky, L. (1997). *Pseudomonas syringae patovars and related pathogens*. Springer-Science + Business Media, B.V.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., . . . Ryals, J. (1993). Requeriments of salycilic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 754-756.

- Gao, X., Cox Jr. , K. L., & He, P. (2014). Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity. *Plants* , 160-176.
- García, A., Ramírez, E., & Molina, J. (2011). El género *Helipisis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*, 146-153.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens . *Annu. Rev. Phytopathol.* , 205-227.
- González-Morales, S., Flores-López, M. L., Benavides-Mendoza, A., & Flores-Olivas, A. (2011). Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *fusarium f. sp lycopersici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 146-153.
- Hammerschmidt, R., & Kuc, J. (1995). *Induced resistance to disease in plants*. Boston and London: Kluwer Academic Publishers.
- Henery, M., Wallis, I. R., Stone, C., & Foley, W. J. (2008). Methyl jasmonate does not induce changes in *Eucalyptus grandis* leaves that alter the effect of constitutive defences on larvae of a specialist herbivore. *Oecologia*, 847-859.
- Hofius, R., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H., Mattsson, O., . . . Petersen , M. (2009). Autophagic components contribute to hypersensitivity cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 773-783.
- Hogenhout, S. A., Van der Horn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 115-122.
- Holeski, L. M., Jander, G., & Agrawal, A. A. (2012). Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance i plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 618-626.
- Hughes, M. K., & Brown, P. M. (1992). Drought frequency in central California since 101 B.C. recorded in giant sequoia tree rings . *Climate Dynamics*, 161-167.

- Jaskiewicz, M. (2011). Chromatin modification acts as memory for systemic acquired resistance in the plants stress response. *European Molecular Biology Organization*, 50-55.
- Jones , A. L. (1999). Phaseolus bean: post-harvest operations. *AGSI/FAO*, 1-25.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 323-329.
- Kachroo, A., & Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinio in Plant Biology*, 527-533.
- Karban, R., & Baldwin, I. T. (1997). *Induced responses to herbivory*. Chicago, Illinois, USA: University of Chicago Press.
- Karban, R., & Myers, J. H. (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 331-348.
- Kuc, J. (1987). Plant immunization and its applicability for disease control. En I. Chet (Ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (págs. 255-274). New York: John Wiley.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., . . . Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO*, 2623-2633.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., . . . Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J*, 71-82.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 251-260.
- Luna, E., Bruce, T. J., Roberts, M. R., Flors, V., & Ton, J. (2012). Next generation systemic acquired resistance . *Plant Physiol.* , 844-853.

- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C., Pozo, M., . . . Conrath, U. (2016). Recognizing plant defense *priming*. *Trends in Plant Science*.
- Méndez-Bavo, A., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Raya-González, J., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., . . . Herrera-Estrella, L. (2011). Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*.
- Molina-Torres, J., & Gacía-Chávez, A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 377-387.
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduced amines. *J. Agric. Food Chem.*, 4700-4704.
- Muñoz-Saldaña, R. (2010). Frijol, rica fuente de proteínas. *Conabio. Biodiversitas*, 7-11.
- Pieterse, C. M. (2012). Prime time for transgenerational defense. *Plant Physiol.*, 545-545.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van Der Does, D., & Van Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.*, 308-316.
- Preston, G. M. (2004). Plant éreptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 907-918.
- Prudencio-Sains, J. M., Vavarrete-Maya, R., Navarrete-Maya, J., & Acosta-Gallegos, A. (2008). Dinpamica de los tizones de halo en el valle de Mexico. *Agricultura Técnica de Mexico*, 201-212.
- Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., & Sun, J. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol*, 854-863.



- Ríos, M. Y. (2012). Natural alkaloids: pharmacology, chemistry and distribution. En O. Vallisuta (Ed.), *Drug discovery research in pharmacognosy* (págs. 107-144). In Tech.
- Salgado-Garciglia, R., Molina-Torres, J., López-Meza, J. E., & Loeza-Lara, P. D. (2008). Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol. *Agrocienci*, 679-688.
- Sanabria, N. M., Huang, J. C., & Dubery, I. A. (2010). Self/nonsel self perception in plants in innate immunity and defense. *Self Nonself*, 40-54.
- Scheffer, R. P. (1997). *The nature of disease in plants*. Cambridge University Press.
- Segonzac, C., & Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 54-61.
- Sequeira, L. (1983). Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review Microbiology*, 51-79.
- Shah, J., & Chaturvedi, R. (2013). *Long-distance systemic signaling and communication in plants*. (F. Baluska, Ed.) Bonn, Nordrhein-Westfalen, Germany.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., & Mauch-Mani, B. (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol.*, 835-843.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 235-270.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 1130-1134.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., . . . Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing

- systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 959-965.
- Vleeshouwers, V. G., & Oliver, R. P. (2014). Effectors as tool in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant Microbe Interact*, 196-206.
- Walters, D. R., & Paterson, L. (2012). Parents lend a helping hand to their offspring in plant defense. *Biology letters* , 871-873.
- War , A. R., Paulraj, M. J., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal & Behavior* , 1306-1320.
- Woelkart, K., & Bauer, R. (2007). The role or alkamides as an active principle of echinacea. *Planta Med.*, 615-623.
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., & Chen, X. (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupensis* (Pamp). *BMC Research Notes*, 1-6.
- Zhang, L., Du, L., & Poovaiah, B. M. (2014). Calcium signalling and abiotic responses in plants. *Plant Signal Behav.* .
- Zipfel, C., & Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 353-360.

## ANEXO 1. Cuantificación de semillas

### Definiciones

- Semilla llena: Semilla que está en buen estado de color y tamaño (SLL).
- Semilla media: Semilla que se encuentra bien, pero de menor tamaño y color amarillento, es posible que sea viable (SM).
- Semilla vacía: Semilla que no se desarrolló, se encuentra pequeña y de colores verdoso o café (SV).

**Tratamiento:** Control (Sin infección y sin inducción)

**Número de plantas:** 10

Planta 1			
Vaina	SLL	S M	SV
1	7	0	0
2	6	0	0
3	5	0	0
4	3	0	1
5	3	0	1
6	2	0	3
7	2	0	1
8	3	0	1

Planta 4			
Vaina	SL L	SM	SV
1	5	0	0
2	5	0	2
3	5	0	0
4	4	0	2
5	1	0	5
6	1	0	0
7	0	0	0

Planta 7			
Vaina	SL L	SM	SV
1	7	0	0
2	3	0	2
3	3	0	2
4	4	0	1
5	1	0	0
6	3	0	0
7	2	0	1
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

Planta 9			
Vaina	SL L	SM	SV
1	2	0	4
2	0	2	3
3	0	1	3
4	2	0	3
5	1	0	4
6	0	0	5
7	2	0	3
8	0	3	2
9	0	1	3
10	3	0	1
11	0	0	3
12	0	1	3
13	2	0	2
14	0	0	0
15	0	0	0

Planta 2 (			
Vaina	SLL	SM	SV
1	1	4	0
2	0	5	2

Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	2
2	4	0	1
3	3	0	2

Planta 8			

3	0	0	3
4	4	0	0
5	0	0	5
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
0	0	0	0

4	2	0	2
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

Planta 6			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	3
2	0	0	2
3	3	0	2
4	0	2	4
5	0	4	2
6	0	1	5
7	0	1	3
8	0	0	7
9	0	6	2
10	0	4	3

Vaina	SL	SM	SV
	L		
1	4	0	1
2	5	0	0
3	4	0	0
4	4	0	3
5	7	0	0
6	2	0	2
7	1	0	1
8	1	0	2
9	0	0	1
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0

Planta 10			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	1
2	0	0	0

**Tratamiento:** Patógeno (Plantas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv Phaseolicola)

**Número de plantas:** 5

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	1	0
2	3	1	1
3	3	0	1
4	1	0	5

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	0
2	5	0	0
3	3	2	0
4	0	1	0

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	5	0
2	4	0	2
3	0	0	2
4	0	0	0

5	0	0	4
6	1	0	3
7	0	1	2
8	0	2	1

5	0	0	0
---	---	---	---

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	2	4

Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
0	0	0	0

**Tratamiento:** Agua-etanol regado (Plantas regadas con 100 mL de etanol:agua en una proporción 1:9)

**Número de plantas:** 6

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	5
2	1	0	4
3	0	1	5

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	4
2	0	0	6
3	0	0	5
4	0	0	5
5	0	0	0

Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	4	0
2	0	0	2

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	2	0
2	0	0	1

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
0	0	0	0

Planta 6			
Vaina	SLL	SM	SV
1	1	0	3
2	0	1	3
3	0	0	0

**Tratamiento:** Agua-etanol asperjado (Plantas asperjadas con una mezcla de de etanol:agua en una proporción 1:9)

**Número de plantas:** 4

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	1	0	1

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
0	0	0	0

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	2	2
5	0	0	0
6	1	0	0
7	0	0	1

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	2	3
2	0	1	2
3	0	1	0
4	0	0	0
5	0	0	0

**Tratamiento:** Afinina regada 600  $\mu M$  (Plantas regadas con afinina 600  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 5

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	2	2
2	4	1	0
3	3	2	2
4	1	0	5
5	2	0	2
	1	0	0
7	5	0	0
8		0	0
9	5	0	0

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	2	0
	4	0	2
3	0	3	1
4	0	3	0
5	0	1	3
6	0	0	4
Planta 3			
8	1	0	0

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	2	0
2	3	2	1
Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	6	1
2	0	6	0

10	5	0	0
11	4	0	1
12	3	0	2
13	3	0	2

Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	4
2	0	3	3
3	0	0	2

3	0	3	1
4	3	0	1
5	0	2	1

**Tratamiento:** Afinina regada 200  $\mu M$  (Plantas regadas con afinina 200  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 5

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	4	1
2	2	0	3
3	3	0	3
4	0	0	1

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	2
2	4	0	1
3	6	0	0
4	4	0	1
5	1	0	3

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	6
2	2	1	2
3	1		1
4	0	0	3
5	0	0	3
6	0	0	1
7	0	0	1

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	1
2	2	0	4
3	4	0	2
4	1	1	3
5	2	0	0
6	1	0	0

Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
1	2	1	1
2	2	0	3
3	1	1	1

**Tratamiento:** Extracto regado 600  $\mu M$  (Plantas regadas con extracto 600  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 5

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	0
2	5	0	0
3	5	0	0
4	5	0	0
5	4	0	1
6	3	0	2
	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	1
2	2	0	4
3	3	0	2
4	4	0	1
5	1	0	3
6		0	2
7	2	0	2

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	0	4
2	0	1	3
3	0	0	5
4	0	0	5
5	1	0	2
6	0	0	0

Planta 5			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	0
2	0	0	6
3	4	0	0
4	1	1	1
5	0	1	3
6	0	0	0
7	0	0	0

**Tratamiento:** Extracto regado 200  $\mu M$  (Plantas regadas con extracto 200  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 3

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	1
2	5	0	0
3	4	1	0
4	3	4	1
5	1	3	2

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	0
2	4	1	0
3	1	1	4
4	4	0	0
5	6		0

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	0
2	5	0	2
3	3	0	2
4	3	0	0
5	2	0	0



6	2	0	2
7	0	2	1
8	2	0	2
9	0	0	4
10	0	0	0

6	4	0	0
7	4	0	1
8	4		0
9	0	3	1
10	3	0	0
11	2	0	1
12	1	0	1

6	4	0	2
7	3	0	2
8	2	0	1
9	2	0	1
10	2	0	1

**Tratamiento:** Afinina asperjada 600  $\mu M$  (Plantas asperjadas con afinina 600  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 9

Planta 1			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	3	2	0
2	3	0	4
3	6	0	0
4	1	2	1
5	2	0	3
6	0	0	3
7	2	0	0
8	1	0	3
9	0	2	1
10	1	0	1

Planta 3			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1		0	0
2	4	0	1
3	5	1	0
4	4	0	0
	1	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0

Planta 5			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	2	0	3
2	2	0	1
3	2	2	1
4	0	1	3
5	0	2	1
6	0	0	0
7	0	0	0

Planta 7			
Vaina	SLL	SM	SV
	1	1	4
2	5	0	0
3	1	1	1
4	2	1	2
5	0	0	0

Planta 8			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	0	4	1
2	0	0	6
3	0	2	3
4	0	0	3
5	0	0	3

Planta 2			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	0	0	5

Planta 4			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	0	0	4
2	0	0	3
3	0	1	1

Planta 6			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	4	2	0
2	4	0	0
3	2	0	1
4	2	0	0

Planta 9			
Vaina	SLL	SM	SV

2	1	0	0
---	---	---	---

4	0	0	0
---	---	---	---

1	0	0	5
2	0	0	5

**Tratamiento:** Afinina asperjada 200  $\mu M$  (Plantas asperjadas con afinina 200  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 8

Planta 1			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	5	1	0
2	6	1	0
3	4	1	0
4	0	4	1
5	0	0	4
6	5		1
7	3	0	2
8	3	1	0
9	7	0	0
10	2	1	0
11	1	1	2
12	4	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Planta 3			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	1	0	6
2	3	0	3
3	5	0	1
4	3	0	2
5	3	0	2
6	1	0	3
7	0	0	5
8	1	0	1

Planta 5			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	4	0	2
2	5	0	0
3	2	1	1
4	1	0	2
5	1	0	2
6	0	0	0
7	0	0	0

Planta 7			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	2	1	2
2	0	0	5
3	0	0	3
4	0	0	4
5	0	0	5
6	0	0	3
7	0	1	2
8	1	0	0

Planta 4			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	4	0	1
2	3	0	0
3	2	0	2
4	0	0	0
5	0	0	0

Planta 6			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	0	4	1
2	2	0	1
3	1	1	1
4	2	0	1
5	4	0	0
6	0	0	2
7	0	0	0
8	0	0	0

Planta 8			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	0	1	3
2	2	0	0
3	0	0	2

Planta 2			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	3	1	2

2	0	0	5
---	---	---	---

**Tratamiento:** Extracto asperjado 600  $\mu M$  (Plantas asperjadas con Extracto 600  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 5

Planta 1 (EAI-25)				Planta 2 (EAI-10)				Planta 3 (EAI-20)				Planta 4 (EAI-S)			
Vaina	SL	SM	S	Vaina	SL	SM	S	Vaina	SL	SM	S	Vaina	SL	SM	S
	L		V		L		V		L		V		L		V
1	5	0	0	1	5	0	0	1	5	0	1	1	0	1	4
2	5	0	1	2	3	0	3	2	6	0	0	2	0	4	2
3	4	0	1	3	3	2	2	3	6	0	0	3	0	0	6
4	4	0	0	4	4	0	2	4	5	0	1	4	1	0	5
5	2	0	2	5	0	0	5	5	6	0	1	5	1	0	4
6	4	0	0	6	0	0	0	6	4	0	1	Planta 5 (EAI-14)			
7	1	0		7	0	2	3	7	4	0	1	Vaina	SL	SM	S
8		0	0	8	0	0	2	8	2	0	0		L		V
9	0	0	0	9	0	0	0	9	2	0	1	1	0	1	4
10	0	0	0	10	0	0	0	10	1	0	0	0	0	3	2
												3	0	1	2

**Tratamiento:** Extracto asperjado 200  $\mu M$  (Plantas asperjadas con Extracto 200  $\mu M$ )

**Número de plantas:** 5

Planta 1			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	6	0	1
2	5	0	2
3	6	0	0
4	6	0	1
5	5	0	2
6	3	1	1
7	5	0	1
8	4	0	1
9	2	2	1
10	4	0	1
11	1	0	1
12	0	0	0

Planta 2			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	7	0	0
2	4	0	3
3	4	0	1
4	2	0	2
5	2	0	4
6	3	0	2
7	3	0	1
8	1	0	5
9	1	0	2
10	3	0	1
11	1	0	1
12	0	2	1
13	1	0	0
14	0	0	0

Planta 3			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	7	0	0
2	7	0	0
3	7	0	0
4	2	0	4
5	1	0	4
6	2	0	2
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Planta 4			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	4	0	1
2	6	0	0
3	4	0	1
4	4	0	1
5	5	1	1
6	3	1	0
7	1	0	0

Planta 5			
Vaina	SL	SM	S
	L		V
1	6	0	0
2	4	0	1

**Tratamiento:** Afinina regada 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con afinina a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	6	0
2	2	2	1
3	1	2	0
4	0	1	2

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	2	0	4
2	0	2	4
3	0	0	6
4	1	0	2

5	0	2	2
6	0	1	3

5	0	0	2
---	---	---	---

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	1

**Tratamiento:** Afinina regada 200  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con afinina a 200  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 2

Planta				Planta 2			
Vain	SLL	SM	SV	Vaina	SLL	SM	SV
1	0	0	2	0	0	0	0

**Tratamiento:** Extracto regado 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con extracto a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

Planta 1				Planta 2			
Vaina	SLL	SM	S	Vaina	SLL	SM	SV
1	7	0	0	1	5	2	1
2	6	0	0	2	6	0	0
3	4	0	1	3	7	0	0

4	4	0	0
5	6	0	0
6	4	0	1
7	4	0	0
8	4	0	0
9	3	0	0
1	4	0	0
11	4	0	0
12	2	0	1
13	2	0	0
14	1	0	2
15	1	0	0
16	1	0	0
17	0	1	0
18	0	0	0

4	5	0	1
5	5	0	0
6	3	0	2
7	1	0	3
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	3	1	1
2	1	1	3
3	0	0	5
4	0	2	3

**Tratamiento:** Extracto regado 200  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con extracto a 200  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	4	0	0
2	6	0	0
3	3	3	0
4	3	0	2
5	0	0	6

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	0
2	7	0	0
3	6	0	0
4	3	0	2
5	3	0	1

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	1
2	4	0	2
3	7	0	0
4	3	0	3
5	1	0	0

6	0	3	2
7	0	1	4
8	3	0	2
9	0	0	0
10	0	0	0

6	3	1	1
7	2	0	0

6	0	0	0
7	0	0	0

**Tratamiento:** Afinina asperjada 600  $\mu$ M + patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 600  $\mu$ M e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 6

Planta 1			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	7	0	0
2	5	0	0
3	4	1	1
4	3	0	2
5	3	0	3
6	1	0	4
7	2	0	2
8	3	0	2
9	1	0	6

Planta 2			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	4	0	1
2	6	0	
3	0		4
4	7	0	0
5	4	0	2
6	3	0	2
7	0	0	6
8	2	0	3
9	0	0	5
10	2	0	3
11	1	0	3
12	2	0	0
13	1	0	2
14	3	0	0
15	1	1	0

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
	1	1	2
2	3	1	0
3	0	1	3
4	1	1	0
5	1	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

Planta 4			
Vaina	SLL	SM	SV
	1	3	1
2	0	1	4
3	0	0	0

Planta 5			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	5	0	0
2	4	0	2
3	3	0	2
4	2	0	5
5	4	0	0
6	2	0	2
7	0	0	0

Planta 6			
Vaina	SL	S	S
	L	M	V
1	0	5	0
2	0	5	0
3	0	0	0

**Tratamiento:** Afinina asperjada 200  $\mu$ M + patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 200  $\mu$ M e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 6

Planta 1			
Vaina	SL L	SM	S V
1	5	0	1
2	6	0	1
3	5	0	1
4	4	0	1
5	4	0	1
6	2	0	2
7	3	0	2
8	2	0	2
9	1	0	1
10	1	0	
11	0	1	1
12	0	1	3
13	2	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Planta 2			
Vaina	SL L	SM	S V
1	5	1	0
2	4	1	1
3	2	2	1
4	3	0	1
5	2	1	1
6	2	2	0
7	4	0	1
8	6	0	0
9	2	0	2
10	3	0	1
11	1	0	1
12	0	0	0
13	0	0	0

Planta 4			
Vaina	SL L	SM	S V
1	5	0	1
2	5	0	0
3	1	2	4
4	1	0	2
5	0	4	1
6	0	3	3
7	2	0	1
8	0	0	3
9	0	2	0
10	1	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	0	4	3
2	3	0	3
3	1	1	2
4	2	1	2
5	2	0	1
6	0	1	3
7	0	2	4
8	0	0	2
9	0	0	0
9	3	0	1
10	1	0	1
11	0	0	0
12	0	0	0

Planta 5			
Vaina	SL L	SM	S V
1	7	0	0
2	0	1	3
3	2	0	2



4	0	4	0
5	2	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

10	0	0	0
----	---	---	---

**Tratamiento:** Extracto asperjada 600  $\mu$ M + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 600  $\mu$ M e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	0
2	4	0	2
3	4	0	1
4	5	0	1
5	5	0	2
6	3	0	2
7	7	0	0
8	4	0	1
9	4	0	0
10	2	0	
11	3		0
12	2	0	0
13	1	0	0
14	1	0	0
15	1	0	1
16	0	0	0

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	0
2	4	0	2
3	7	0	0
4	6	0	1
5	6	0	2
6	4	0	1
7	2	0	3
8	3	2	1
9	2	0	2
10	0	2	2
11	0	2	4

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	2	0	2
2	1	2	1
3	5	0	1
4	3	2	1
5	5	1	0
6	6	0	0
7	3	0	0
8	2	0	2

17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
21	0	0	0

---

**Tratamiento:** Extracto asperjada 200  $\mu$ M + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 200  $\mu$ M e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas: 3**

Planta 1			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	1
2	6	0	0
3	3	0	0
4	3	1	0
5	2	1	0
6	2	0	1
7	0	2	0
8	0	0	2

Planta 2			
Vaina	SLL	SM	SV
1	5	0	0
2	4	0	

Planta 3			
Vaina	SLL	SM	SV
1	6	0	1
2	5	0	0
3	2	0	0
4	1	0	0
5	0	0	0

---

## ANEXO 2. Peso seco

Peso seco del tallo de <i>Phaseolus vulgaris</i> L (g)									
C	P	EAR	EAA	AR600	AR200	ER600	ER200	AA600	AA200
5.9	4.9	1.9	6.4	5.8	3.9	5.5	5.3	5.6	5.4
4.1	5.3	3.4	5.7	4.2	5.7	2.3	5.8	6.1	6.3
5.5	4.3	5.7	4.9	4.8	2.3	5.3	6.4	5.3	3.8
3.6	4.3	3.9	5	6.7	6.4	4.3	5.1	4.5	5.8
3.3	6.3	4.8	4	5.4	7	5.2	5.7	6.7	5.9
2.7	3.3	4.7	5.2	1.1	4.9	4.5	0.6	6	5.7
6	4.7	4.1	0.9		2.1	1.3		6.3	5.6
5.8	1	1.3						5.2	6.8
3.2								6	3.7
3.3								5.7	5.5
4.3								0.67	1
1.3									
EAG00	EA200	ARP600	ARP200	ERP600	ERP200	AAP600	AAP200	EAP600	EAP200
5.1	4.3	6	3.9	6.3	7	6.2	6.6	4.8	5.2
4.8	6.6	7.4	6.1	7	6.9	5.7	6.2	5.2	5.7
6.2	4.1	6.4	4.9	6	6.9	5.3	5.5	5.7	4.5
4.9	5.4	6.6	5	6.4	0.1	6	32	5.2	7.1
5	5.1	0.7	1.1	0.5		6.3	5	0.5	5.6
5.2	5.1					4.4	4.5		1.1
0.6	1					5.6	5.1		
						0.7	1.2		

<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>AR600</b>	<b>ER600</b>	<b>EAR</b>	<b>P</b>	<b>ARP600</b>	<b>ERP600</b>
$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$	$\frac{\mu g_{ac.jas}}{g_{peso\ fresco}}$
2.6	3	2.1	1.8	3.5	4.5	9.5	7.2
5.7	6.6	4.43	5.8	2.5	8.4	7.6	4.6
2.8	6	4.5	7.1	7.7	5.3		
2.7	5.8	5	1.6	2	4.6		
2.9				1.1			
1.8							

### ANEXO 3. Datos de cinética

Fecha	Hora	Inóculo		Concentración de afinina					Control bacteria			
		$\mu L$	$50 \mu M$	$200 \mu M$	$600 \mu M$	$1200 \mu M$						
13-07-2015	14:20	0.5	0.027	0.029	0.028	0.028	0.044	0.026	0.061	0.030	0.039	0.026
		5	0.027	0.035	0.030	0.018	0.039	0.030	0.074	0.019	0.023	0.022
		1.5	0.009	0.008	0.013	0.010	0.022	0.016	0.041	0.008	0.015	0.015
		3	0.005	0.006	0.008	0.011	0.024	0.009	0.042	0.015	0.007	0.012
	20:00	0.5	0.053	0.056	0.050	0.055	0.076	0.054	0.085	0.061	0.069	0.053
		5	0.055	0.068	0.053	0.040	0.067	0.065	0.097	0.047	0.048	0.049
		1.5	0.025	0.019	0.025	0.025	0.037	0.026	0.057	0.015	0.030	0.024
		3	0.025	0.021	0.028	0.028	0.046	0.025	0.067	0.023	0.023	0.025
	23:00	0.5	0.012	0.015	0.009	0.014	0.035	0.013	0.044	0.020	0.028	0.013
		5	0.014	0.028	0.012	-0.001	0.027	0.025	0.056	0.006	0.007	0.008
		1.5	0.034	0.028	0.035	0.036	0.049	0.034	0.074	0.030	0.038	0.034
		3	0.040	0.031	0.043	0.039	0.064	0.040	0.089	0.040	0.033	0.038
2:00	0.5	0.089	0.092	0.083	0.088	0.104	0.094	0.111	0.096	0.108	0.091	
	5	0.093	0.112	0.091	0.063	0.100	0.098	0.131	0.083	0.078	0.083	
	1.5	0.053	0.046	0.053	0.062	0.069	0.052	0.092	0.049	0.053	0.050	
	3	0.061	0.050	0.063	0.055	0.081	0.060	0.114	0.061	0.049	0.055	
5:30	0.5	0.114	0.120	0.108	0.121	0.124	0.117	0.121	0.120	0.137	0.119	
	5	0.114	0.139	0.112	0.080	0.111	0.120	0.146	0.105	0.105	0.112	
	1.5	0.073	0.067	0.074	0.084	0.083	0.077	0.115	0.069	0.068	0.072	
	3	0.085	0.072	0.085	0.081	0.097	0.089	0.149	0.083	0.071	0.082	
9:00	0.5	0.136	0.148	0.122	0.146	0.130	0.136	0.130	0.151	0.173	0.148	
	5	0.130	0.159	0.124	0.096	0.132	0.145	0.158	0.127	0.138	0.149	
	1.5	0.104	0.095	0.100	0.109	0.108	0.097	0.134	0.091	0.089	0.093	
	3	0.109	0.098	0.108	0.109	0.113	0.112	0.177	0.109	0.096	0.108	
12:00	0.5	0.169	0.173	0.141	0.168	0.140	0.159	0.131	0.174	0.200	0.183	
	5	0.167	0.189	0.151	0.113	0.148	0.164	0.167	0.151	0.168	0.181	
	1.5	0.133	0.134	0.116	0.125	0.121	0.123	0.144	0.129	0.112	0.125	
	3	0.145	0.127	0.133	0.133	0.119	0.135	0.195	0.141	0.124	0.139	
15:00	0.5	0.190	0.197	0.183	0.201	0.162	0.201	0.168	0.212	0.223	0.192	
	5	0.198	0.232	0.188	0.138	0.161	0.209	0.196	0.206	0.191	0.202	
	1.5	0.144	0.140	0.140	0.146	0.148	0.152	0.178	0.156	0.134	0.138	
	3	0.163	0.159	0.160	0.168	0.145	0.170	0.212	0.176	0.151	0.165	
18:00	0.5	0.204	0.219	0.185	0.220	0.166	0.208	0.167	0.224	0.233	0.203	
	5	0.196	0.236	0.200	0.151	0.169	0.209	0.179	0.208	0.194	0.198	
	1.5	0.166	0.172	0.154	0.175	0.146	0.166	0.178	0.165	0.155	0.160	
	3	0.175	0.178	0.159	0.176	0.132	0.174	0.187	0.186	0.163	0.184	
21:30	0.5	0.233	0.249	0.188	0.219	0.158	0.219	0.160	0.232	0.243	0.226	
	5	0.221	0.254	0.188	0.156	0.162	0.217	0.167	0.215	0.205	0.223	

<b>15-07-2015</b>	<b>0:30</b>	1.5	0.196	0.204	0.163	0.198	0.141	0.181	0.170	0.187	0.180	0.181
		3	0.201	0.192	0.166	0.207	0.125	0.193	0.170	0.210	0.188	0.206
		0.5	0.062	0.094	0.029	-0.003	0.002	0.057	0.008	0.055	0.046	0.063
		5	0.036	0.044	0.004	0.039	-0.019	0.022	0.011	0.028	0.021	0.021
		1.5	0.108	0.104	0.114	0.112	0.046	0.098	0.074	0.129	0.125	0.133
		3	0.069	0.009	-0.011	0.019	-0.002	0.006	0.020	0.025	0.028	0.037
	<b>3:30</b>	0.5	0.295	0.302	0.212	0.287	0.164	0.270	0.166	0.265	0.277	0.241
		5	0.268	0.322	0.227	0.227	0.155	0.269	0.169	0.267	0.252	0.268
		1.5	0.274	0.281	0.241	0.284	0.178	0.265	0.219	0.276	0.262	0.260
		3	0.293	0.284	0.270	0.292	0.175	0.265	0.212	0.285	0.270	0.288
		0.5	0.261	0.278	0.203	0.281	0.164	0.276	0.164	0.272	0.289	0.256
		5	0.228	0.293	0.213	0.216	0.149	0.268	0.160	0.270	0.261	0.279
	<b>7:00</b>	1.5	0.234	0.254	0.194	0.245	0.134	0.236	0.150	0.260	0.231	0.222
		3	0.237	0.250	0.209	0.254	0.126	0.237	0.157	0.266	0.231	0.256
		0.5	0.262	0.282	0.203	0.286	0.160	0.284	0.164	0.289	0.302	0.266
		5	0.238	0.297	0.211	0.229	0.143	0.285	0.159	0.291	0.275	0.294
		1.5	0.229	0.244	0.187	0.250	0.137	0.245	0.145	0.262	0.236	0.228
		3	0.220	0.240	0.210	0.255	0.119	0.239	0.154	0.266	0.229	0.260
	<b>10:00</b>	0.5	0.264	0.294	0.204	0.296	0.158	0.298	0.158	0.300	0.315	0.283
		5	0.248	0.318	0.210	0.252	0.138	0.301	0.159	0.311	0.297	0.313
		1.5	0.061	0.081	0.050	0.096	-0.040	0.080	-0.005	0.107	0.070	0.100
		3	0.105	0.135	0.045	0.137	-0.001	0.138	-0.001	0.140	0.156	0.123
		0.5	0.265	0.306	0.192	0.305	0.154	0.283	0.147	0.295	0.323	0.296
		5	0.246	0.317	0.210	0.257	0.130	0.304	0.156	0.315	0.294	0.323
<b>13:00</b>	1.5	0.217	0.231	0.179	0.236	0.122	0.230	0.118	0.249	0.237	0.219	
	3	0.215	0.238	0.201	0.254	0.102	0.247	0.135	0.270	0.241	0.266	
	0.5	0.255	0.295	0.198	0.301	0.152	0.294	0.151	0.300	0.316	0.296	
	5	0.236	0.304	0.208	0.255	0.128	0.295	0.153	0.309	0.294	0.315	
	1.5	0.204	0.241	0.179	0.229	0.104	0.227	0.100	0.237	0.235	0.215	
	3	0.201	0.231	0.184	0.241	0.086	0.236	0.123	0.261	0.228	0.258	
<b>16:00</b>	0.5	0.255	0.295	0.198	0.301	0.152	0.294	0.151	0.300	0.316	0.296	
	5	0.236	0.304	0.208	0.255	0.128	0.295	0.153	0.309	0.294	0.315	
<b>18:30</b>	1.5	0.204	0.241	0.179	0.229	0.104	0.227	0.100	0.237	0.235	0.215	
	3	0.201	0.231	0.184	0.241	0.086	0.236	0.123	0.261	0.228	0.258	

#### ANEXO 4. Resultados de UFC

**Tratamiento:** Patógeno (Plantas infectadas con *Pseudomonas syringae* pv Phaseolicola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras tomadas:** 4

Patógeno				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	900	128	1800000	2560000
2	1078	112	2156000	2240000
3	350	72	700000	1440000

**Tratamiento:** Afinina regada 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con afinina a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

ARP600				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	571	0	1142000	0
2	0	0	0	0
3	2700	251	5400000	5020000
3	1100	0	2200000	0

**Tratamiento:** Afinina regada 60  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con afinina a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

ARPG0				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$

1	3000	680	6000000	13600000
1	1000	0	2000000	0
2	1800	0	3600000	0
2	3700	0	7400000	0
3	672	0	1344000	0
3	420	0	840000	0

**Tratamiento:** Extracto regado 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con extracto a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

ERP600				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	0	67	0	1340000
1	0	196	0	3920000
2	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0

**Tratamiento:** Extracto regado 60  $\mu M$  + patógeno (Plantas regadas con extracto a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

ERP60				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	756	71	1512000	1420000
1	0	640	0	12800000
2	0	151	0	3020000
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0



3	0	98	0	1960000
---	---	----	---	---------

**Tratamiento:** Afinina asperjada 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

AAP600				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0

**Tratamiento:** Afinina asperjada 60  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola)

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

AAP60				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	201	0	402000	0
1	281	206	562000	4120000
2	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	504	0	1008000	0
3	1200	0	2400000	0

**Tratamiento:** Extracto asperjada 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

EAP600				
--------	--	--	--	--

Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	0	714	0	14280000
1	0	0	0	0
2	0	263	0	5260000
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0

**Tratamiento:** Extracto asperjada 60  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 12

EAP60				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	0	33	0	660000
1	100	363	200000	7260000
2	0	282	0	5640000
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
3	0	0	0	0

**Tratamiento:** Afinina asperjada 600  $\mu M$  sobre planta infectada con patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 6

AASP600				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	Incontable	0	-	0
2	Incontable	639	-	12780000

3	Incontable	326	-	6520000
---	------------	-----	---	---------

**Tratamiento:** Afinina asperjada 60  $\mu M$  sobre planta infectada con patógeno (Plantas asperjadas con afinina a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 6

AASP60				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	Incontable	410	-	8200000
2	Incontable	264	-	5280000
3	Incontable	0	-	0

**Tratamiento:** Extracto asperjada 600  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 600  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 6

EASP600				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	Incontable	544	-	10880000
2	Incontable	0	-	0
3	Incontable	0	-	0

**Tratamiento:** Extracto asperjada 60  $\mu M$  + patógeno (Plantas asperjadas con extracto a 60  $\mu M$  e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. phaseolícola).

**Número de plantas:** 3

**Número de muestras:** 6

EASP60				
Planta	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	$\frac{N_{células}}{cm^2}$	$\frac{N_{células}}{cm^2}$
1	Incontable	2800	-	56000000
2	Incontable	1884	-	37680000
3	Incontable	514	-	10280000
3	Incontable	424	-	8480000