



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

UNIDAD IRAPUATO

**Efecto de la activación de *priming* en el desarrollo de nódulos en frijol
y su relación en la resistencia contra *Pseudomonas syringae* pv.
*phaseolicola***

Tesis que presenta:

IBT. Evelia Lorena Coss Navarrete

Por obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de :

Biotecnología de Plantas

Directores de Tesis:

Dr. Raúl Álvarez Venegas

Dr. Stefan de Folter

Irapuato, Guanajuato

Julio, 2018

El presente trabajo se realizó en colaboración entre el Laboratorio de Cromatina y Epigenética del Departamento de Ingeniería Genética, de la Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Raúl Álvarez Venegas y el Laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, de la Unidad de Genómica Avanzada, bajo la dirección del Dr. Stefan de Folter, ambos investigadores titulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico durante mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato, por las facilidades, materiales y espacio de trabajo para llevar a cabo mis estudios y experimentos.

Al Dr. Raúl Alvarez Venegas por aceptarme desde mis primeras prácticas profesionales y de nueva cuenta en el posgrado, por hacerme parte de su equipo de trabajo. Así como de la paciencia, asesoría y crecimiento personal brindada durante el desarrollo de mi tesis de maestría.

Al Dr. Stefan de Folter por aceptarme en su equipo de trabajo y darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto en su laboratorio, además de su buena vibra y asesoría.

Al Dr. Aáron Barraza por ser mi mentor desde mis primeras prácticas profesionales, por enseñarme todas las técnicas y enseñarme a amar el trabajo de laboratorio. Además por presentarme al Dr. José Luis Cabrera.

Al Dr. José Luis Cabrera y a su equipo de trabajo (Itzel y Sandra) por todo sus conocimientos, paciencia y grandes enseñanzas que han marcado hoy y siempre mi vida.

A la Dra. Joanna Serwatowska por aceptarme como su cachorra, por todas sus enseñanzas, paciencia y sobre todo por siempre estar para mi con una sonrisa, por transmitirme sus conocimientos de laboratorio y personales.

A mis asesores el Dr. John Paul Délano Frier y el Dr. Luis Eugenio González de la Vara por su atención y consejos sobre mi proyecto, con el fin de lograr un completo desarrollo de mi tesis.

Al Dr. José Peña y a su auxiliar Dr. Antonio Vera, por su apoyo, enseñanzas, préstamo de equipos y materiales.

A José Luis Hernández, nuestro auxiliar del laboratorio, por todo ese gran apoyo que me ha brindado en el laboratorio, facilitando el material y reactivos para mis experimentos, así como por todos aquellos momentos difíciles en

los cuales él fue mi gran farol de luz. Gracias por todas esas lágrimas que volviste sonrisas.

A mis compañeros de laboratorio, sobre todo al equipo de trabajo del Dr. Stefan por todas esas risas y alegrías generadas, por hacerme parte de su manada, apoyo, amor y paciencia.

A mis amigos Betty, Angela, Jordan, Mónica y Eliana, por hacer mi estancia muy feliz, por su amor, paciencia y alegrías. Los amo mucho. A mi pequeña aprendiz, Amairani por ser un apoyo invaluable en la realización de este proyecto. Y a todas las personas que hicieron mi estancia en CINVESTAV inolvidable.

DEDICATORIA

A Dios por siempre mostrarme el camino, apoyarme y ayudarme a cumplir mis sueños. Le dedico este logro y los que faltan a mi padre Dios, y le doy gracias por mis habilidades y dones para lograr concluir mis metas.

A mis padres por su confianza, apoyo, paciencia y amor brindada durante todo este tiempo, no solo ahora, si no porque siempre han estado para mi en las buenas y en las malas. Los amo mucho.

A mis mejores amigos Miriam, Flavio, Brenda y Yaneth, los cuales a pesar de la distancia siempre están presentes en mi mente y en mi corazón.

A la señora Angelica Pérez y a sus amorosos hijos, Angelo y Emmanuel, por mostrarme el valor de la familia, por hacerme parte de su vida, por su amor, enseñanzas y gran apoyo en todos estos años.

ABREVIATURAS

FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno	°C	Grados centígrados
Factores Nod	Factores de nodulación	μL	Microlitros
LCO	Lipoquitoligosacárido	mL	mililitros
dpg	Días post-germinación	mM	milimolar
dpi	Días post-infección	ng	nanogramos
SA*	Ácido salicílico	cm ²	Centímetro cuadrado
ET*	Etileno	g	gramos
JA*	Ácido jasmónico	h	horas
ABA*	ácido abscísico	min	minutos
PtdIns*	Fosfatidilinositol	Tm	Temperatura de fusión
BABA	Ácido β-aminobutírico	DNA*	Ácido desoxirribonucleico
INA	Ácido isonicotínico	cDNA*	DNA complementario
BTH	Benzotiadiazol	RNA*	Ácido ribonucleico
Kb	Kilobases	mRNA*	RNA mensajero
KDa	Kilodaltones	Oligo dT	Oligonucleótido de deoxi-timina
CG	Cromatografía de gases	pb	Pares de bases
GUS	Enzima β-glucoronidasa	x g	Fuerza de gravedad
qRT-PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real	PGPR*	Bacterias promotoras del crecimiento de plantas
EF1α*	Factor de elongación 1 α	UFC	Unidades formadoras de colonias
UTR*	Región sin transcribir	PY*	Medio de peptona-levadura
PTI	Inmunidad inducida por patógenos	KB*	Medio B de King

ETI	Inmunidad inducida por efectores BABA-IR	Resistencia inducida por BABA
MAMPS	Patrones moleculares asociados HR a microbios	Respuesta hipersensible
PAMPS	Patrones moleculares asociados ISR* a patógenos	Resistencia sistémica inducida
SAR*	Resistencia sistémica adquirida	

*Por razones prácticas, se optó por utilizar nomenclatura original en inglés.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Modelo de estudio.....	3
1.1 Importancia del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	3
1.2 Morfología del Frijol.....	4
1.2.1 Raíz.....	4
1.2.2 Nódulos.....	4
1.2.3 Tallo.....	5
1.2.4 Hojas.....	6
1.2.5 Inflorescencia.....	7
1.2.6 Flores.....	8
1.2.7 Fruto.....	8
1.3 Mejoramiento ante patógenos que afectan a frijol.....	9
1.3.1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	9
1.4 Asociación simbiótica <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	12
2. Principios del sistema inmune vegetal.....	14
2.1 Defensa por sustancias análogas al SA.....	15
2.2 Defensa por rizobacterias benéficas.....	17
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
□ Objetivo general:.....	19
□ Objetivos específicos:.....	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Material empleado.....	21
4.2 Desinfección y germinación de semillas.....	21

4.3	Medición radicular, trasplante y fertilizaciones	21
4.4	Preparación de la solución B&D	21
4.5	Activador sintético del priming.....	23
4.5.1	BABA	23
4.5.2	Aplicación del Activador sintético	23
4.6	Medios de cultivo para <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899-GUS	23
4.6.1	Pre-inóculo de <i>R. tropici</i> -GUS	24
4.6.2	Inóculo de <i>R. tropici</i> -GUS	24
4.6.3	Suspensión e inoculación con <i>R. tropici</i> -GUS	24
4.7	Medios de cultivo para <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	24
4.7.1	Pre-inóculo de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	25
4.7.2	Inóculo de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	25
4.7.3	Suspensión e inoculación con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	25
4.8	Diseño experimental y tomas de muestras.....	25
4.8.1	BABA 0 dpj	26
4.8.2	BABA 10 dpj	26
4.8.3	BABA 3 dpj	26
4.8.4	Tratamientos.....	27
4.8.5	Tomas de muestras.....	30
4.8.5.1	BABA 0 dpj	30
4.8.5.2	BABA 10 dpj	31
4.8.5.3	BABA 3 dpj	33
4.8.6	Distribución del número de plantas	34
BABA 0 dpj	34	
BABA 10 dpj	35	
BABA 3 dpj	36	
4.9	Análisis fenotípico	37
4.9.1	Efecto en la germinación con BABA en las raíces.....	37
4.9.2	Medición de altura.....	37

4.9.3	Medición de radícula	37
4.9.4	Peso fresco	38
4.9.5	Porcentaje de daño en hojas	38
4.9.6	Conteo de nódulos	38
4.9.7	Mediciones del diámetro de nódulos.....	38
4.9.8	Unidades formadoras de colonias (UFC)	39
4.9.8.1	UFC de <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> de hojas infectadas	39
4.9.8.2	UFC de <i>R. tropici</i> -GUS de nódulos maduros	40
4.10	Fijación biológica de nitrógeno	41
4.11	Histología en nódulos	46
4.11.1	Protocolo de tinción de GUS	46
4.11.2	Protocolo de fijación en Paraplast.....	48
4.12	Extracción de RNA total	49
4.13	Síntesis de cDNA	50
4.14	Diseño de oligonucleótidos para q-PCR.....	50
4.15	Análisis de expresión por PCR.....	52
4.16	Análisis de expresión por q-PCR	53
4.17	Cuantificación de la expresión génica por qPCR	54
V.	RESULTADOS	55
5.1	OE1. Analizar los cambios fenotípicos en hojas, raíces y nódulos al aplicar BABA, <i>R. tropici</i> -GUS y <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	55
5.1.1	Efecto en la germinación con BABA en las raíces	55
5.1.2	Medición de altura	57
BABA 0 dpj	59
BABA 10 dpj	60
BABA 3 dpj	60
5.1.3	Largo de la raíz principal	61
BABA 0 dpj	61
BABA 10 dpj	62

BABA 3 dpg	63
5.1.4 Peso fresco de la parte aérea.....	64
BABA 0 dpg	64
BABA 10 dpg	65
BABA 3 dpg	65
5.1.5 Peso fresco de las raíces.....	66
BABA 0 dpg	66
BABA 10 dpg	67
BABA 3 dpg	68
5.1.6 UFC de <i>P. syringae</i> de hojas infectadas.....	68
BABA 0 dpg	69
BABA 10 dpg	70
BABA 3 dpg	72
5.1.7 Porcentaje de daño por <i>P. syringae</i>	73
BABA 0 dpg	74
BABA 10 dpg	75
BABA 3 dpg	76
5.1.8 UFC de <i>R. tropici</i> -Gus de nódulos	76
BABA 0 dpg	76
BABA 10 dpg	78
BABA 3 dpg	79
5.1.9 Número de nódulos.....	81
BABA 0 dpg	81
BABA 10 dpg	81
BABA 3 dpg	82
5.1.10 Diámetro de nódulos.....	83
BABA 0 dpg	83
BABA 10 dpg	84
BABA 3 dpg	85

5.2	OE2. Analizar la fijación de nitrógeno y morfología interna de nódulos en plantas tratadas con BABA e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>.	85
5.2.1	Reducción de acetileno	85
1)	Eficiencia de la FBN	86
	BABA 0 dpg	86
	BABA 10 dpg	87
	BABA 3 dpg	87
2)	Cantidad de nmoles fijados por peso fresco y número de nódulos presentes en la reacción	88
	BABA 0 dpg	88
	BABA 10 dpg	91
	BABA 3 dpg	93
5.2.2	Cortes histológicos.....	96
	Protocolo de tinción de GUS.....	96
	Protocolo de fijación en paraplast.....	97
5.3	OE3. Determinar la expresión de genes de defensa en hojas, raíces y nódulos de plantas de frijol primadas con BABA durante la infección de <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i>.	97
VI.	DISCUSIÓN	101
VII.	CONCLUSIONES	107
VIII.	PERSPECTIVAS.....	109
	REFERENCIAS.....	110

RESUMEN

La asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa comienza con un intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria. Como resultado de esta asociación, el proceso de infección inicia en los pelos radiculares y la formación de un nuevo órgano, conocido como nódulo. Dentro de los nódulos, se da la fijación del nitrógeno. Durante este proceso *Rhizobium* desencadena el sistema de defensa dependiente de ácido jasmónico (JA) y/o etileno (ET) conocida como Resistencia Sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), siendo relacionada en el incremento en la defensa contra patógenos. De manera similar, la aplicación de ácido β -aminobutírico (BABA), incrementa la defensa contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* desencadenando la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) en plantas de frijol. Tanto la vía de SAR como la de ISR, se encuentran relacionadas con una activación más rápida y/o eficiente de la respuesta defensiva de la planta, conocido como “*priming*”, ante un segundo estímulo, resultando en el aumento del nivel de resistencia contra un patógeno. Se ha demostrado que la concentración relativa de cada hormona, el tiempo y la secuencia de inicio de la señalización del ácido salicílico (SA) y JA, y posiblemente ET; son importantes para determinar si la interacción entre ambas vías será antagónica, neutral o sinérgica. Por lo que surge el interés en analizar la activación de *priming* y la resistencia contra *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol tratadas con BABA e inoculadas con *Rhizobium tropici* y su efecto en la formación de nódulos funcionales.

En este proyecto, encontramos que el incremento en la resistencia contra *P. syringae* pv. *phaseolicola*, en plantas de frijol inoculadas con *R. tropici* a los 3 dpv (días después de la germinación) y la aplicación de BABA a los 10 dpv, presenta un efecto en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno involucrando cambios en el tamaño, número y el contenido de bacteria en los nódulos maduros. Además, la combinación de estos factores incrementó la fijación de nitrógeno comparado con el control.

Por lo que proponemos el uso de activadores de *priming*, como BABA, para generar plantas resistentes a diversas enfermedades en cultivos de interés agronómico, y en particular ayudar a la producción de nuevas variedades de frijol resistentes a patógenos y que además, cuenten con una mayor capacidad de fijación de nitrógeno por parte de los nódulos. Con los resultados encontrados en este trabajo se contribuye incrementar el conocimiento entre las interacciones planta-microorganismo y cambios fenotípicos relacionados con el costo beneficio de la activación de la defensa cuando ISR y SAR convergen.

ABSTRACT

The symbiotic relationship Rhizobium-Legume is mediated by an exchange of chemical signals between the plant and the bacteria. As result of this association, the infection process begins and a new organ, the root-derived nodule, is formed. Within the nodule, atmospheric nitrogen fixation occurs. During this symbiotic process, *Rhizobium* triggers the jasmonic acid (JA) and ethylene (ET)-dependent response pathways, a mechanism known leading to an Induced Systemic Resistance (ISR), which increases the plant defense against pathogens. In a similar way, application of β -aminobutyric acid (BABA) induces resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* infection, via the Systemic Acquired Resistance (SAR), in bean plants. Both pathways (ISR and SAR) display a faster and/or stronger activation of the plant defense responses against a second stimulus (e.g. a subsequent attack by pathogens). This physiological condition known as “priming”, has often been associated with enhanced resistance to a broad spectrum of biotic and/or abiotic types of stress. It has been shown that the relative concentration of each hormone, the time and the sequence of initiation of salicylic acid (SA) and JA signaling are important to determinate the type of interaction between both pathways, if it will be antagonistic, neutral or synergistic in the plant.

Here we show that enhanced resistance against the pathogen *P. syringae* pv. *phaseolicola*, in common bean plants inoculated with the symbiont *Rhizobium tropici* at 3 dpv and treated with BABA at 10 dpv, has a direct effect in the development of nitrogen-fixing root nodules involving size, number and the content of bacterium in the mature nodules. Also the combination of these factors increases the fixation of nitrogen compared to untreated controls.

We propose that the use of priming activators, like BABA, will allow us to generate disease resistant crop varieties, and in particular it will help us to produce new bean varieties resistant to pathogens and with an enhanced nitrogen-fixation capacity. Thus, the results presented in this work will increase our knowledge on the plant-microorganism interaction and the morphological changes involving with the activation of the plant defense when ISR and SAR pathways are activated simultaneously in the same plant.

I. INTRODUCCIÓN

1. Modelo de estudio

1.1 Importancia del frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol se originó y domesticó en América Latina con dos orígenes geográficos (Mesoamérica y los Andes) genéticamente diferenciables que derivan de un ancestro común de 100,000 años de antigüedad (Bitocchi, et al., 2013).

El frijol es del género *Phaseolus* y su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* Linnaeus, asignado por Linnaeus en 1753. Perteneció a la tribu Phaseoleae de la subfamilia Papilionoideae, familia Leguminosae dentro del orden Rosales (Cardona & Kornegay, 1999; CIAT, 1984).

La planta de frijol es anual, herbácea, intensamente cultivada desde el trópico hasta las zonas templadas, aunque es una especie termófila, es decir, que no soporta heladas; se cultiva esencialmente para obtener las semillas, las cuales tienen un alto contenido proteico, alrededor del 20-25%, contenido calculado a partir de la materia seca (CIAT, 1984). Constituye una de las principales fuentes de proteína en la dieta mediterránea (Broughton, et al., 2003), siendo el tercer cultivo más importante en el mundo, entre las leguminosas, después de la soya y el cacahuete (Ma & Bliss, 1978; Singh, Teran, Muñoz, & Takegami, 1999). Particularmente en México, el frijol es la leguminosa de mayor consumo humano y representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas (Lara-Flores, 2015).

El frijol es producido en las 32 entidades del país, sin embargo, las que aportan la mayor parte del volumen son Zacatecas, con el 35.9% de la producción nacional; Durango con 11.6%; Chihuahua, 9.5%; Sinaloa, 8.9% y Chiapas con el 5.5%. En México, el consumo per cápita de este producto es de 8.4 kilogramos al año y el valor de la producción se estima en 9.5 mil millones de pesos (SAGARPA, 2017).

Cuenta con una ventaja adaptativa al asociarse a diversos organismos del suelo, entre los que destacan bacterias del género *Rhizobium* (Ben Rebah, Tyagyi, & Prévost, 2002), interacción que desencadena la formación de un nuevo órgano en la planta, conocido como nódulo, por medio del cual se realiza la fijación del nitrógeno atmosférico en suelos con deficiencia de nitrógeno (De Felipe Antón, 2004; Ben Rebah, Tyagyi, & Prévost, 2002).

En relación con la cantidad de nitrógeno fijado en los ecosistemas terrestres, la mayor contribución proviene de los sistemas simbióticos, especialmente la asociación *Rhizobium*-leguminosa con un 50% de todo el nitrógeno fijado en la tierra (FAO, 1995).

1.2 Morfología del Frijol

1.2.1 Raíz

La primera etapa en el desarrollo del sistema radical está formada por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. A los pocos días de la emergencia de la radícula es posible observar las raíces secundarias, que se desarrollan especialmente en la parte superior o cuello de la raíz principal (Figura 1) (CIAT, 1986).

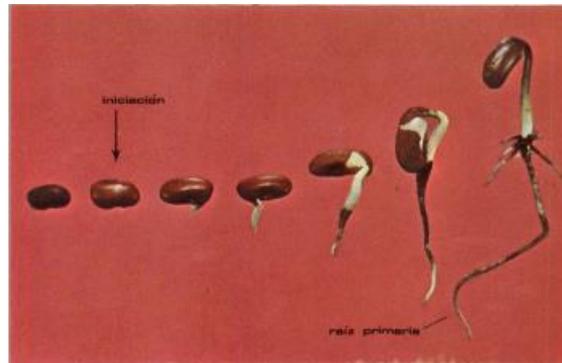


Figura 1. Desarrollo del sistema radicular durante la germinación
(CIAT, 1986).

Se encuentran de 3 a 7 de estas raíces en disposición de corona y tienen un diámetro menor al de la raíz principal. Se denominan secundarias debido a que su desarrollo ocurrió a partir de la raíz primaria. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como son los pelos absorbentes. Los cuales además se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz, especialmente en las partes jóvenes de las raíces, jugando un papel importante en la absorción de agua y nutrientes (CIAT, 1984).

1.2.2 Nódulos

Como miembro de la subfamilia Papilionoideae, *Phaseolus vulgaris* L. presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radicular (Figura 2). Estos nódulos tienen forma poliédrica y un diámetro aproximado de 2 a 5mm. Son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico. Contribuyendo de esta manera a satisfacer los requerimientos de este elemento en la planta (CIAT, 1984).



Figura 2. Nódulos en la parte superior de la radícula en frijol variedad BAT477 (Coss-Navarrete).

1.2.3 Tallo

El tallo es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. Su pigmentación puede variar de verde, rosa y morado. Su desarrollo empieza en la inserción de las raíces (CIAT, 1984).

En orden ascendente, el primer nudo que se encuentra es el de los cotiledones; éste se caracteriza por tener dos inserciones opuestas correspondientes a los cotiledones. Siendo la primera parte del tallo comprendida entre la inserción de las raíces y el primer nudo, llamada hipocótilo. El hipocótilo tiene una longitud apreciable porque el frijol común es de germinación epigea (Figura 3) (CIAT, 1984).

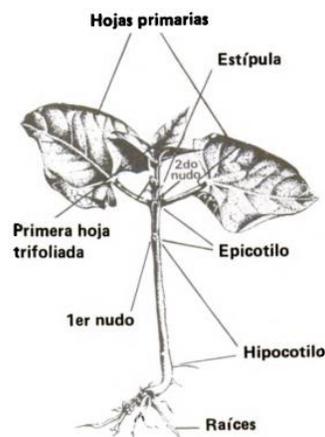


Figura 3. Plántula de frijol (CIAT, 1984).

En las plántulas denominadas epigeas, los cotiledones emergen del suelo debido a un considerable crecimiento del hipocótilo. Posteriormente, en los cotiledones se diferencian los cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos y actuando como si fueran hojas (Figura 4) (CIAT, 1984).

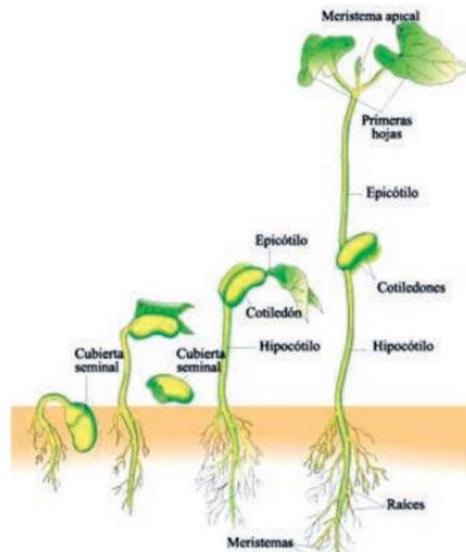


Figura 4. Germinación epigea en semilla de frijol (FAO, 2013).

En el siguiente nudo se encuentran las hojas primarias, las cuales son opuestas entre sí. Entre el nudo de los cotiledones y el de las hojas primarias, se encuentra un entrenudo real llamado epicotilo. A nivel de cada nudo existen otros órganos como las hojas trifoliadas, las ramas, los racimos y la flores (FAO, 2013).

1.2.4 Hojas

Las hojas de frijol se encuentran insertadas en los nudos del tallo y las ramas, existiendo dos tipos: simples y compuestas (Figura 5). Las hojas primarias son simples, aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis. Son opuestas, cordiformes, unifoliadas, auriculadas, simples y acuminadas. Estas caen antes de que la planta esté completamente desarrollada (CIAT, 1984).

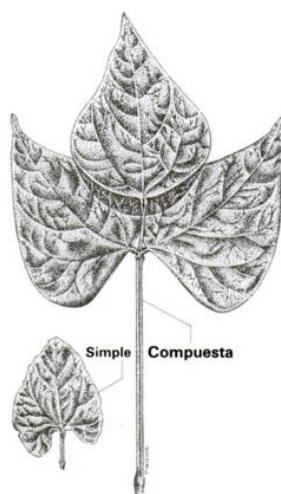


Figura 5. Tipos de hojas de la planta de frijol (CIAT, 1984).

Las hojas compuestas son trifoliadas y son las hojas típicas del frijol. Tienen tres folíolos, un pecíolo y un raquis. Tanto el pecíolo como el raquis son acanalados. El folíolo central o terminal es simétrico y acuminado; los dos laterales son asimétricos y también acuminados (Figura 5) (CIAT, 1984).

1.2.5 Inflorescencia

Las inflorescencias pueden ser axilares o terminales. Desde el punto de vista botánico se consideran como racimos de racimos, es decir, un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas (triada floral) que se encuentra en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis. El raquis es una sucesión de nudos (CIAT, 1984).

En la inflorescencia se pueden distinguir tres componentes principales: el eje de la inflorescencia que se compone de pedúnculo y raquis, las brácteas primarias y los botones florales. Antes de abrir las primeras flores, el pedúnculo de la inflorescencia se alarga rápidamente. Los nudos se distinguen porque en ellos se localizan las brácteas primarias (CIAT, 1984).

En cada triada floral cada una de las dos yemas laterales generalmente produce una flor; estas dos yemas laterales son las dos primeras que aparecen sobre el eje del racimo secundario, en sucesión alterna (Figura 6). En cambio, la yema central no se desarrolla directamente, como el eje es muy reducido, las dos flores parecen estar al mismo nivel (CIAT, 1984).

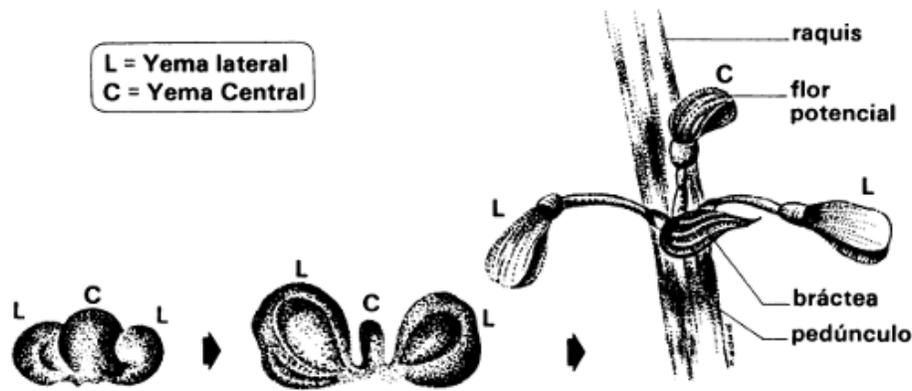


Figura 6. Desarrollo de la triada floral (CIAT, 1984).

En algunos casos, especialmente cuando las vainas, producto del desarrollo de las flores laterales están ya desarrolladas, la yema central puede producir un pequeño eje con otra triada floral. De esta nueva triada puede resultar una tercera flor (Figura 6). El desarrollo a partir de la tercera flor está limitada por fenómenos de competencia, ya que al madurar las vainas de las dos primeras yemas, la planta generalmente está en la etapa de maduración y por lo tanto presenta disminución de su actividad fotosintética y normalmente esta flor ya no se desarrolla (CIAT, 1984).

1.2.6 Flores

En el proceso de desarrollo de la flor se pueden distinguir dos estados; el botón floral y la flor completamente abierta. El botón floral, bien sea que se origine en las inserciones de un racimo o en el desarrollo completamente floral de las yemas de una axila, en su estado inicial está envuelto por las bractéolas que tienen forma ovalada o redonda. En su estado final, la corola que aún está cerrada sobresale y las bractéolas cubren solo el cáliz. Cuando ocurre el fenómeno de antesis la flor se abre (CIAT, 1984).

La morfología floral de *P. vulgaris* L., favorece el mecanismo de autopolinización. Lo anterior debido a que las anteras están al mismo nivel que el estigma y además ambos órganos están envueltos completamente por la quilla. Cuando se produce la dehiscencia de las anteras (antesis) el polen cae directamente sobre el estigma (CIAT, 1984).

1.2.7 Fruto

El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Puesto que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Dos suturas aparecen en la unión de las dos valvas. Una es la sutura dorsal, llamada placentar y la otra sutura se denomina como sutura ventral (CIAT, 1984).

Los óvulos, que son las futuras semillas, alternan en la sutura placentar. En consecuencia, las semillas también alternan en las dos valvas. Las vainas pueden ser de diversos colores, uniformes o con rayas, existiendo diferencias entre las vainas jóvenes o estado inmaduro, las vainas maduras y las vainas completamente secas. El color dependerá de la variedad (CIAT, 1984).

1.3 Mejoramiento ante patógenos que afectan a frijol

La formación de variedades mejoradas a las enfermedades ocupa uno de los primeros lugares en el programa de mejoramiento de frijol en México. Siendo las enfermedades muy numerosas, debido a la diversidad de climas que prevalecen en las áreas donde se cultiva frijol, en cada región existen diferentes microorganismos capaces de tener una mayor incidencia o intensidad (Miranda, 1966).

Este mejoramiento ha consistido de la realización de cruces entre variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad, ya sea ocasionada por bacterias (*Pseudomonas phaseolicola* Dows, *Xanthomonas phaseoli* Dows y *Corynebacterium flaccumfaciens* Dows), hongos (*Uromyces phaseoli* Var *typica* Arth, *Collectotrichum lindemuthianum* Briose & Cav, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium solani* Snyder & Hansen, *F. phaseoli* Snyder & Hansen, *Chaeypseptoria welmani* Stev, *Sclerotinia sclerotiorum* Dby y *Isariopsis griseola* Sacc) o virus (*Virus phaseolus* No.1 y *Virus phaseolus* No.2) (Miranda, 1966).

1.3.1 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

A. Taxonomía

Es una proteobacteria, del orden *Pseudomonadales*, familia *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, especie *Pseudomonas syringae*, variedad patogénica *phaseolicola* (Arnold, Lovell, Jackson, & Mansfield, 2011).

B. Propiedades microbiológicas

Es una bacteria Gram-negativa, cuenta con forma de bacilo, es aeróbica y posee flagelos polares (Samayoa, 2010; Castaño-Zapata & Mendoza, 1994; Arnold, Lovell, Jackson, & Mansfield, 2011), su tamaño es de 1.5µm de longitud y 0.7-1.2µm de diámetro, cuenta con un crecimiento óptimo a 25-30°C (Arnold, Lovell, Jackson, & Mansfield, 2011).

P. syringae es una bacteria hemibiotrófica, es decir, con una fase inicial biotrófica con un mayor contacto intracelular y una posterior actividad necrotrofica, con el uso de enzimas degradativas, toxinas o ambas, generando un daño posterior al tejido vegetal. Teniendo la capacidad de vivir tanto en la superficie y el apoplasto de la planta (Block & Alfano, 2011).

Es el agente causal de la enfermedad conocida como “**tizón de halo**”, siendo una de las enfermedades de frijol con importancia a nivel mundial (USDA, 2013; CIAT, 2010; Arnold, Lovell, Jackson, & Mansfield, 2011).

C. Síntomas

Los síntomas en las hojas aparecen tras varios días después de la infección con pequeñas manchas en el envés y en el haz, con presencia de manchas acuosas de unos 3 a 6mm de diámetro. Alrededor de las manchas necróticas se desarrolla un halo amarillo verdoso, con un diámetro de 2.5cm. En casos de infección severa en las hojas, las plantas desarrollan clorosis sistémica generalizada. Los síntomas también se pueden observar en las vainas y tallos como lesiones marrones acuosas que pueden presentar exudado bacteriano (USDA, 2013; CIAT, 1981; Arnold, Lovell, Jackson, & Mansfield, 2011; Taylor J. , Teverson, Allen, & Pastor-Corrales, 1996a).

Temperaturas de 16-20°C, humedad relativa alta (>80%), lluvia y rocío, favorecen la producción de la **faseolotoxina**, toxina producida por *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Hagedorn & Inglis, 1986; CIAT, 2010; Campos, 1991; Fourie, 2002; Zaumeyer & Thomas, 1957; Patel & Walker, 1963). La faseolotoxina actúa como un inhibidor reversible de la enzima ornitil carbamoiltransferasa (OCTasa Ec. 2.1.3.3), que cataliza la conversión de ornitina y carbamoilfosfato a citrulina, dentro de la principal ruta biosintética de arginina en plantas (Mitchell, Bean halo-blight toxin, 1976; Mitchell, 1976; Arvizu-Gómez, 2011).

Debido a su acción sobre la enzima OCTasa, la toxina ocasiona la acumulación de ornitina, niveles bajos de citrulina y arginina, así como un efecto inhibitorio en la síntesis de clorofila, ocasionando la clorosis en las hojas. Además de ocasionar la clorosis, la faseolotoxina facilita la invasión sistémica de la planta contribuyendo de manera significativa a la virulencia del patógeno (Templeton, Sullivan, & Shepherd, 1984; Ferguson & Johnston, 1980; Turner & Mitchell, 1985) (Figura 7).

En las vainas los puntos son ovalados y acuosos, pueden alcanzar hasta 9mm de diámetro y llegan a ser hundidas volviéndose de color marrón con la edad. A menudo hay un exudado de color crema en las lesiones de las vainas y al secarse dejan una lesión café rojiza (Hagedorn & Inglis, 1986; CIAT, 2010; Schwartz, 1989; Rudolph, 1984) (Figura 7).

El follaje superior de la planta se vuelve de un color amarillo característico de la infección, además las semillas infectadas pueden ser de un menor tamaño que las normales con la cobertura arrugada y decolorada (Hagedorn & Inglis, 1986; CIAT, 2010).

La bacteria se transmite por medio de la semilla, lo que facilita su dispersión al siguiente ciclo. Además, se dispersa por medio del salpique de agua y por el viento (Hagedorn & Inglis, 1986; CIAT, 2010; Saettler, 1991).

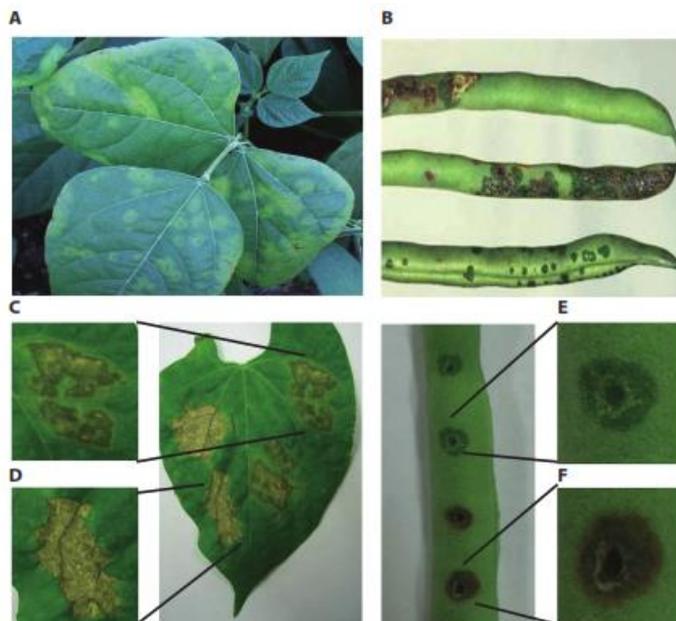


Figura 7. Síntomas producidos por *P. syringae* pv. *phaseolicola* en frijol (*Phaseolus vulgaris*). Síntomas de la enfermedad presentes en hojas (A) y vainas (B). Síntomas presentes a las 72h después de la infección (C), caracterizado por la presencia de manchas acuosas y necrosis con halos amarillos, y respuesta a hipersensibilidad (HR, D), caracterizado por el tejido colapsado y pardeamiento del área infectada. (E) y (F) demuestran la respuesta a la enfermedad y la HR, respectivamente, en las vainas de frijol (Taylor, Teverson, & Davies, 1996b; Murillo, Bardaji, & Führer, 2010).

D. Pérdidas anuales y manejo de cultivos

En México el cultivo del frijol (*P. vulgaris* L.) con frecuencia es atacado por enfermedades bacterianas como los tizones común y de halo, los cuales tienen una amplia distribución en las zonas productoras de esta leguminosa (Campos, 1991; Navarrete, 1996). El tizón común, provocado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, está considerado entre los cuatro problemas fitopatológicos más importantes de México (Becerra & Pastor-Corrales, 1994; López, 1991). Se ha estimado que las pérdidas que provoca en el rendimiento varían del 15 al 30% (Campos, 1991). Por otra parte, en Idaho y Michigan, EUA las pérdidas en el rendimiento causadas por el tizón de halo varían del 23 al 43%, siendo considerada un serio problema por lo que se demanda que los cultivos que contengan *P. syringae* pv. *phaseolicola* deben ser destruidos (Schwartz, 1989; Prosen, Hatziloukas, Schaad, & Panopoulos, 1993).

Esta enfermedad está controlada principalmente mediante la siembra de semillas libres de patógenos, el uso de variedades resistentes y a través de la rotación de cultivos (Hagedorn & Inglis, 1986; CIAT, 2010; Taylor, Teverson, & Davies, 1996b).

Actualmente, ambas enfermedades del frijol se encuentran presentes en México, en localidades de los estados de Guanajuato, Puebla, Estado de México, Durango y Zacatecas (Acosta-Gallegos, et al., 2010), con incidencias mayores al 50% en etapas tempranas del desarrollo por parte del tizón del halo, obteniendo este porcentaje en etapas reproductivas por parte del tizón común en frijol (Prudencio-Sains, Navarrete-Maya, Navarrete-Maya, & Acosta-Gallegos, 2008; Fourie, 2002).

1.4 Asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa

Los mecanismos que han permitido a las leguminosas establecerse en prácticamente todos los ecosistemas terrestres, comprenden la asociación simbiótica que establece con bacterias de la familia Rhizobiaceae, principalmente con los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, los cuales infectan y nodulan preferencialmente a diferentes géneros de leguminosas. Estas Proteobacterias, gram-negativas capaces de interactuar con las leguminosas son colectivamente llamadas rhizobia (Allen & Allen, 1981; Van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Taiz & Zeiger, 2002).

Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, se produce un intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria, en donde la planta libera flavonoides de los pelos radiculares (Phillips, 1992) y la bacteria en respuesta libera los factores de nodulación (factores Nod), también conocidos como lipoquitooligosacáridos (LCOs) por su semejanza estructural con el oligosacárido quitina (Dénarié & Cullimore, 1993; Dénarié, Debelle , & Rosenberg, 1992; Moat, Foster, & Spector, 2002) (Figura 8). El efecto del factor Nod implica la desdiferenciación y activación de la división celular en algunas células del parénquima del cortex (Mylona, Pawlowski, & Bisseling, 1995; Gualtieri & Bisseling, 2000), dando como resultado la formación de un nuevo órgano en la planta, el nódulo fijador de nitrógeno. Es aquí donde las bacterias se alojan y llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los nódulos completan su madurez a una edad biológica de 24 días después de la germinación (dpg) o 21 días después de la inoculación (dpi) (Taiz & Zeiger, 2002).

Usualmente, los nódulos se forman en las raíces de las plantas y en baja frecuencia en los tallos de algunas leguminosas. En esta simbiosis las bacterias aportan a la planta una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. A cambio, la leguminosa cede a las bacterias esqueletos de carbono para sus funciones vitales (Taiz & Zeiger, 2002).

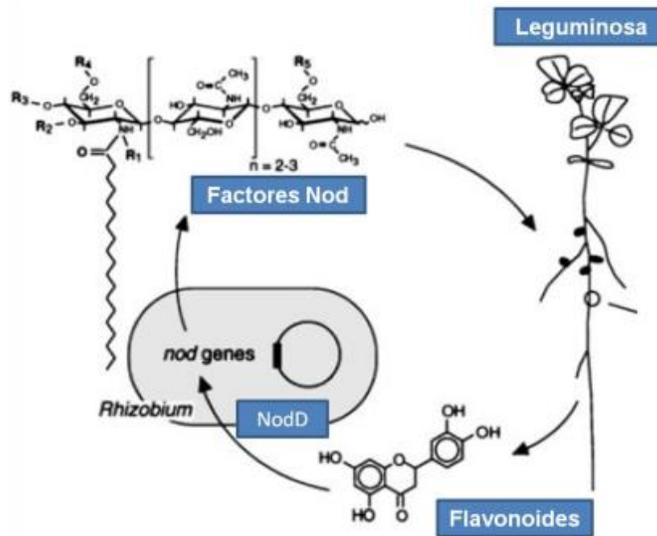


Figura 8. Diálogo molecular establecido entre la planta leguminosa y *Rhizobium*.
Modificado de Schultze & Kondrosi, 1998.

La FBN es uno de los fenómenos de mayor importancia en la naturaleza, debido a la asociación con varios distintivos: 1) representa la utilización de un gas inerte como fuente de nitrógeno por un reducido número de microorganismos; 2) el nitrógeno fijado puede ser directa o indirectamente aprovechado por plantas de interés agrícola y/o forestal, a través de las relaciones simbióticas y; 3) constituye el mecanismo natural para compensar las pérdidas del elemento en forma gaseosa hacia la atmósfera (Peña-Cabrales, La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas, 2000).

La FBN puede ser estimada en 175 millones de toneladas métricas por año, o aproximadamente el 70% de todo el nitrógeno fijado en la tierra cada año (Figura 9) (FAO, 1995).

Fijación de nitrógeno	millones de toneladas métricas por año
Fijación industrial (Haber-Bosch)	40
Fijación atmosférica (rayos, etc.)	10
Combustión (industria, automóviles)	20
Ozonización	15
Fijación biológica de N ₂	175

Figura 9. Fuentes de fijación de nitrógeno en el suelo (FAO, 1995).

Se ha estimado que el 50% de todo el nitrógeno fijado en la tierra proviene de asociaciones *Rhizobium*-leguminosa (FAO, 1995). Sin embargo, la cantidad de nitrógeno que puede fijar la simbiosis está en función de la cepa de rhizobio, la planta y los factores

ambientales (Peña-Cabriales, La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas, 2000).

El nitrógeno se encuentra presente en un 78-79% en el volumen de aire en forma de N_2 . En el suelo se encuentra en forma de minerales como KNO_3 y $NaNO_3$. Se asimila en la epidermis de la raíz, donde se encuentran los pelos radiculares (Leghari, et al., 2016; Taiz & Zeiger, 2002). De todas las especies, las leguminosas son las que están mejor provistas de nitrógeno gracias a esta interacción simbiótica (Taiz & Zeiger, 2002).

De esta forma, un nutriente tan abundante en la atmósfera, aproximadamente el 78%, pero no disponible para los sistemas vivos como es el N_2 se vuelve disponible debido este fenómeno. Confiriendo una gran ventaja a aquellas plantas que tienen acceso a esta fuente inagotable de nitrógeno como es el aire (Peña-Cabriales, La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas, 2000).

2. Principios del sistema inmune vegetal

Se han descrito dos niveles principales de defensa (Jones & Dangl, 2006). El primer nivel, implica el reconocimiento de microorganismos potencialmente patógenos, siendo garantizado el reconocimiento por receptores de patrones que detectan patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (del inglés, PAMPs o MAMPs, respectivamente) (Schwessinger & Zipfel, 2008). Este reconocimiento genera una resistencia basal llamada inmunidad innata activada por PAMP o MAMP, conocidas como PTI o MTI, confiriendo una baja resistencia a los patógenos (Jones & Dangl, 2006). El reconocimiento exitoso de las MAMPs y PAMPs genera una activación baja pero efectiva en la respuesta inmune de la planta en tejidos sistémicos, produciendo con frecuencia niveles bajos de H_2O_2 , activación de genes relacionados con la patogénesis (PR) y la deposición de la callosa (Mishina & Zeier, 2007; Van Wees, Van der Ent, & Pieterse, 2008).

El segundo nivel, es la inmunidad desencadenada por efectores conocida como ETI, la cual implica la interacción directa o indirecta entre el producto de un gen de resistencia del huésped y una proteína efectora codificada por un patógeno (Jones & Dangl, 2006; Xin & He, 2013). Representa un mecanismo fuerte y específico en la inducción de defensa en la planta. Entre las manifestaciones generadas por la defensa tipo ETI, se encuentra la respuesta hipersensible (HR) (Senthil-Kumar & Mysore, 2013; Vlot, Dempsey, & Klessig, 2009). Como consecuencia de esta respuesta, la resistencia sistémica adquirida (SAR) es activada, generando la resistencia contra un amplio espectro de patógenos (Vlot, Dempsey, & Klessig, 2009; Senthil-Kumar & Mysore, 2013; Ryals, et al., 1996; Fu & Dong, 2013). Además, la interacción entre la planta y bacterias u hongos benéficos en el suelo, generan la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR), (Weller, et al., 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Haas & D'Ágostino, 2005)

Ambos niveles, se encuentran íntimamente ligados con el fenómeno de *priming* o primado, el cual es un estado inducido en el que la planta está preparada para reaccionar más rápidamente y/o más eficientemente cuando se encuentra expuesta ante un segundo estrés (biótico o abiótico), resultando en un incremento en el nivel de resistencia de la planta (Conrath, Priming of induced plant defence responses, 2009; Balmer, Pastor, Gamir, Flors, & Mauch-Mani, 2015). Los costos limitados del estado de primado a menudo se compensan con los beneficios en la defensa ante la presión del patógeno o herbivoría en el ambiente (Vos, Pieterse, & Van Wees, 2013).

Las especies reactivas de oxígeno y el ácido salicílico (SA) son esenciales para la correcta respuesta de activación para PTI, ETI y SAR (Herrera-Vásquez, Salinas, & Holuigue, 2015). No solo la hormona SA es importante para la regulación de la respuesta inmune en las plantas, también dependen del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). La señalización por JA y ET puede actuar sinérgicamente para activar genes relacionados con la defensa, principalmente contra patógenos necrotróficos e insectos masticadores (Pieterse, Leon-Reyes, Van der Ent, & Van Wees, 2009).

La concentración relativa de cada hormona, el tiempo y la secuencia de inicio de la señalización del SA y JA son importantes para determinar si la interacción entre ambas vías será antagónica, neutral o sinérgica (Caarls, Pieterse, & Van Wees, 2015; Koornneef, et al., 2008; Liu, et al., 2016; Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon-Reyes, & Van Wees, 2012).

2.1 Defensa por sustancias análogas al SA

Se ha demostrado que tanto el SA, como sus análogos funcionales [Ácido isonicotínico (INA), Benzotriazoles (BTH) y el ácido β -aminobutírico (BABA)] inducen la resistencia contra diferentes patógenos (Gorlach, et al., 1996; He & Wolyn, 2005; Sahebani & Hadavi, 2009), incluyendo hongos, bacterias, virus y nemátodos (Kessmann, et al., 1994; Cohen, B-amino butyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*, 1994; Oostendorp & Seikora, 1990; Sahebani, Hadavi, & Zade, 2011).

BABA es un aminoácido no proteínico, usado como inductor en la resistencia contra un gran número de patógenos en diferentes cultivos (Oka, Cohen, & Speigel, 1999; Lee, Hong, Sanwald, & Hwang, 2000). Aplicado por aspersión foliar y por riego en el suelo genera la inducción local y sistémica de los mecanismos de defensa en varias plantas (Lee, Hong, Sanwald, & Hwang, 2000; Martínez-Aguilar, Ramírez-Carrasco, Hernández-Chávez, Barraza, & Alvarez-Venegas, 2016).

La aplicación de BABA genera la resistencia contra patógenos biotróficos y necrotróficos, basando este efecto a la activación del *priming* (Conrath, Pieterse, & Mauch-Mani, Priming in plant pathogen interactions, 2002). Esta vía de señalización de defensa se conoce como resistencia inducida por BABA (BABA-IR), la cual difiere de SAR e ISR (Widmann, Gibson, Jarpe, & Johnson, 1999). En *Arabidopsis thaliana*, BABA es capaz

de incrementar la resistencia contra la bacteria hemibiotrófica *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), generando la expresión del gen *PR1*, un gen relacionado con la vía SAR, en plantas inoculadas con la bacteria. De tal forma que en plantas infectadas se obtiene un rápido incremento de este gen en las plantas tratadas previamente con BABA (Zimmerli, Jakab, Metraux, & Mauch-Mani, 2000). Además se ha observado la dependencia de BABA-IR hacia el SA y NPR1, una proteína de señalización que actúa corriente debajo del SA (Suarez-Rodriguez, Petersen, & Mundy, 2010).

De manera adicional, BABA también ha demostrado generar la protección en plantas de vid con la activación potencial de genes relacionados al JA, tales como *LOX-9* y *PR-4* (Hamiduzzaman, Jaka, Barnavon, Neuhaus, & Mauch-Mani, 2005) (Figura 10).

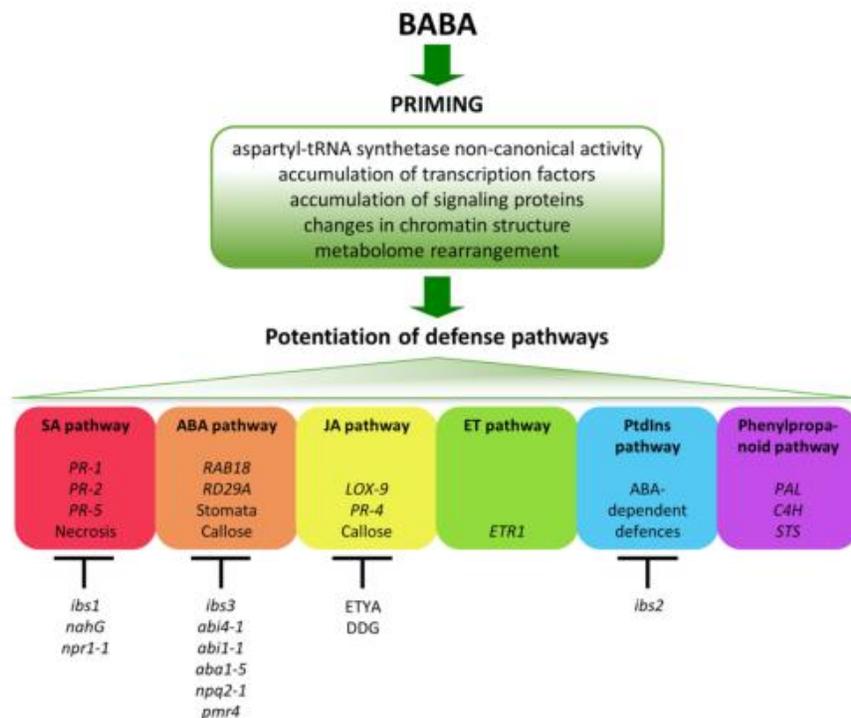


Figura 10. Señalización de vías potenciales de defensa activados por BABA. Una vez activado el estado de *priming* por BABA, a través de los diferentes mecanismos propuestos en la literatura, la planta puede mejorar su resistencia o tolerancia contra un estrés definido impulsado por ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), fosfatidilinositol (PtdIns) y fenilpropanoides. (Bacelli & Mauch-Mani, 2016).

Por su parte, en frijol se ha aplicado BABA por riego, obteniendo la activación de los genes *PR1*, *PR4*, *NPR1*, *WRKY29*, *WRKY53* y *WRKY6* en plantas primadas con BABA e inoculadas con *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Por lo que se ha propuesto que, confiere resistencia a las plantas, otorgándoles la oportunidad para sobrevivir ante el ataque de este patógeno, con un efecto local marcado en la disminución del porcentaje de daño

ocasionado por la bacteria y el contenido de bacteria presente en la hoja infectada (Martínez-Aguilar, Ramírez-Carrasco, Hernández-Chávez, Barraza, & Álvarez-Venegas, 2016).

2.2 Defensa por rizobacterias benéficas

Las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) colonizan la rizósfera de muchas especies de plantas generando efectos positivos, como el incremento en el crecimiento de las plantas, reducción de la susceptibilidad a enfermedades y el incremento en la tolerancia al estrés abiótico (Kloepper, Ryu, & Zhang, 2004; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Yang, Kloepper, & Ryu, 2009).

El control biológico usando PGPR ha sido reconocido como una herramienta atractiva para el manejo de enfermedades en la agricultura moderna y es considerado una alternativa o sustitución al empleo de agroquímicos para combatir patógenos (Babalola, 2010; Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012; Bhattacharyya & Jha, 2012; Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Barka, 2005). Las PGPR cuentan con una serie de mecanismos para el control de patógenos, como el antagonismo, la producción de antibióticos, interferencia de señal, competición de nutrientes en los nichos, competición de iones férricos por la producción de sideróforos y la activación del sistema de defensa de la planta, con lo que activan la defensa tipo ISR (Weller, et al., 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Haas & Défago, 2005).

ISR es un estado de la capacidad de defensa mejorada o incrementada generada en una planta colonizada por PGPR u hongos benéficos (PGPF, por sus siglas en inglés) (Van der Ent, y otros, 2009; van Loon L. , 2007; van Loon, Bakker, & Pieterse, 1998; Naznin, et al., 2014). En plantas activadas o primadas por ISR, la respuesta de defensa no se activa directamente sino que se aceleran cuando se produce el ataque de un patógeno o insecto, dando como resultado la defensa mejorada contra el atacante (Van Wees, Van der Ent, & Pieterse, 2008).

La vía de señalización hormonal activada y la colonización de una PGPR inductora del ISR, genera una interacción específica para hacer frente al ataque de los patógenos dependiente del tipo de planta, bacteria patógena y la combinación de la cepa PGPR usada (De Vleeschauwer & Höfte, 2009). El empleo de una bacteria activadora de la vía ISR como es *P. aeruginosa* 7NSK2 en *Arabidopsis* activa la vía ISR de una manera independiente al SA, pero la misma PGPR empleada en tabaco genera la activación de ISR dependiente de SA (De Meyer, Audenaert, & Höfte, 1999).

Bacillus cereus AR156 puede desencadenar la vía ISR a través de la activación simultánea de las vías del JA y ET, lo que resulta en un mayor nivel de protección en *Arabidopsis* debido a la activación de los genes de defensa *PR1*, *PR2*, *PR5* y *PDF1.2* (Niu, et al., 2011).

Existen muchos reportes que discuten sobre la interacción antagónica presente entre las vías SA y JA, pero también existen reportes de interacciones sinérgicas (Liu, et al., 2016; Mur, Kenton, Atzorn, Miersch, & Wasternack, 2006). Las concentraciones relativas de SA y JA presentes en las plantas son importantes para determinar los niveles de expresión génica. Así, se ha observado una interacción sinérgica transitoria de los genes asociados con ambas vías de señalización del JA (*PDF1.2*) y del SA (*PR1*), cuando se aplican ambas hormonas en plantas de tabaco en concentraciones bajas (Mur, Kenton, Atzorn, Miersch, & Wasternack, 2006). De igual manera, las plantas tratadas con *Paraburkholderia phytotfirmans* PsJN generaron la protección contra el patógeno *Pst* DC3000, en plantas de *Arabidopsis*, debido a la activación de los genes *PR1* y *PDF1.2*, generándose un sinergismo entre la vía ISR y SAR (Timmermann, et al., 2017).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En plantas inoculadas con *Rhizobium tropici* y primadas con BABA se favorece la formación de nódulos funcionales y la defensa contra el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

OBJETIVOS

♣ Objetivo general:

Analizar la activación de *priming* y la resistencia contra *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol tratadas con BABA e inoculadas con *Rhizobium tropici* y su efecto en la formación de nódulos funcionales.

♣ Objetivos específicos:

OE1. Analizar los cambios fenotípicos en hojas, raíces y nódulos al aplicar BABA, *R. tropici*-GUS y *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

OE2. Determinar el nivel de fijación de nitrógeno y analizar la morfología interna de nódulos en plantas tratadas con BABA e infectadas con *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

OE3. Determinar la expresión de genes de defensa en hojas, raíces y nódulos de plantas de frijol primadas con BABA durante la infección por *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

III. JUSTIFICACIÓN

La generación de variedades mejoradas a las enfermedades ha ocupado uno de los primeros lugares en el programa de mejoramiento de frijol en México. Basando este mejoramiento en la realización de cruza entre variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad, ya sea ocasionada por bacterias, hongos o virus. *P. syringae* pv. *phaseolicola* una bacteria causal de la enfermedad conocida como “tizón del halo”, ha sido considerada como una enfermedad de importancia a nivel mundial, con pérdidas del 23 al 43% en la producción total del frijol. Esta enfermedad está controlada principalmente mediante la siembra de semillas libres de patógenos, el uso de variedades resistentes y a través de la rotación de cultivos. Sin embargo sigue siendo un problema constante al transmitirse esta bacteria por semilla. Por lo que es importante la búsqueda de nuevas herramientas de mejoramiento en plantas, que reduzcan el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos, que a la larga generan el deterioro del suelo.

Considerando que la defensa por *priming* provee beneficios de adaptación a ambientes hostiles, una inducción de los mecanismos de defensa por *priming* puede incrementar los niveles de adaptación de poblaciones enteras de plantas (de interés comercial), bajo condiciones de estrés o enfermedad, de forma generacional y transgeneracional.

Actualmente se han analizado los efectos generados con la aplicación de análogos funcionales a la vía del SA, como es BABA, en la defensa contra patógeno en diversas especies de plantas; así como la relación simbiótica, entre las bacterias benéficas activadoras de la vía del ISR. Lo anterior con la finalidad de ser empleados como una herramienta atractiva en el manejo de enfermedades en la agricultura moderna. Pudiendo disminuir o sustituir el uso de agroquímicos y fertilizantes altos en nitrógeno.

Existen muchos reportes que han descrito la interacción antagónica generada entre la vía del SA y JA. Sin embargo, se ha demostrado que no hay nada escrito, ya que ambas vías son capaces de relacionarse sinérgicamente dependiendo de las concentraciones relativas de cada hormona, el tiempo y la secuencia en que se da la señal.

En este trabajo se buscan identificar las condiciones óptimas para el establecimiento del primado de defensa durante la relación simbiótica *Rhizobium*-frijol, sin que ésta se vea afectada y que además otorgue un aumento en la resistencia contra *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Para lograr lo anterior se realizará la aplicación de BABA en tres tiempos distintos respecto a la inoculación con el simbionte *Rhizobium*.

Así, los esfuerzos para el mejoramiento de los cultivos agrícolas deben incluir el uso de activadores del *priming* de defensa para activar la resistencia inducida en el campo y para seleccionar individuos en la progenie con resistencia inducida.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material empleado

Se utilizaron semillas de frijol de la variedad BAT477 provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Celaya, México.

La cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899-GUS empleada, fue donada gentilmente por el Dr. Federico Sánchez Rodríguez del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Esta cepa cuenta con la integración de la enzima β -glucuronidasa (GUS) dentro de su genoma.

La cepa *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 y el inductor sintético Ácido β -aminobutírico (BABA, SIGMA-ALDRICH Chemistry, Cat. A44207-5G) fueron proporcionada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato.

4.2 Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de frijol de la variedad BAT477 se desinfectaron en una solución de Etanol al 100% por 5 min y en una solución al 20% de hipoclorito de sodio con el 1% de Tween 20 por 40 min. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en camas de germinación con papel absorbente, previamente esterilizadas con UV por 15 min, con ayuda de unas pinzas estériles y se taparon con papel aluminio. Las semillas se colocaron a 28°C por 3 días para su germinación.

4.3 Medición radicular, transplante y fertilizaciones

Las semillas germinadas a los 3 días post-germinación (dpg) se transfirieron a macetas de 2.3L con vermiculita estéril. Se realizaron riegos cada tercer día con agua destilada y una fertilización por semana con la solución de B&D (1 mM CaCl_2 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 10 μM Citrato ferrico, 0.25 mM MgSO_4 , 0.25 mM K_2SO_4 , 1 μM MnSO_4 , 2 μM H_3BO_3 , 0.5 μM ZnSO_4 , 0.2 μM CuSO_4 , 0.1 μM CoSO_4 , 0.1 μM Na_2MoO_4 ; Broughton & Dilworth, 1971) suplementando con nitrógeno (8 mM KNO_3 ; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007) para las plantas que no se inocularon con el *R.tropici*-GUS. Por otra parte, en las plantas que fueron inoculadas con *R.tropici*-GUS se llevó a cabo el mismo riego, pero con una solución de B&D sin nitrógeno.

4.4 Preparación de la solución B&D

Para la fertilización de las plantas se utilizó la solución B&D propuesta por Broughton & Dilworth (1971), las cantidades utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 1. Elementos que conforman la solución B&D y sus concentraciones.

Elementos	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g/L) para la solución stock	Concentración de la solución stock	Nombre asignado a la solución
CaCl ₂	147.01	294.02	2.0 M	Solución A
KH ₂ PO ₄	136.09	139.1	1.0 M	Solución B
Citrato Férrico	244.9	6.7	20 mM	Solución C
MgSO ₄	246.5	123.3	0.5 M	Solución D
K ₂ SO ₄	174.26	87.0	0.5 M	
MnSO ₄	169.01	0.338	2 mM	
H ₃ BO ₃	61.83	0.247	4 mM	
ZnSO ₄	287.56	0.288	1 mM	
CuSO ₄	249.68	0.100	4 mM	
CoSO ₄	281.1	0.056	2 mM	
Na ₂ MoO ₄	205.92	0.048	2 mM	

Tabla 2. Solución KNO₃.

Elementos	Peso molecular (g/mol)	Cantidad (g/L) para solución stock	Molaridad (M) de la solución stock
KNO ₃	101.10	101.10	1.0

Tabla 3. Proporciones para la solución B&D.

Solución	Concentración Inicial	1L	3L	4L	Concentración final
Solución A	2.0 M	0.5 mL	1.5 MI	2 mL	1 mM
Solución B	1.0 M	0.5 mL	1.5 MI	2 mL	500 µM
Solución C	20 mM	0.5 mL	1.5 MI	2 mL	10 µM
Solución D	Varia por elementos	0.5 mL	1.5 MI	2 mL	Varia por elementos
Con nitrógeno					
8 mM KNO ₃	1 M	8 mL	24 mL	32 mL	8 mM
H ₂ O destilada estéril	---	Aforar a 1L	Aforar a 3L	Aforar a 4L	---

4.5 Activador sintético del priming

4.5.1 BABA

Se empleó como activador del primado de defensa al Ácido β -aminobutírico (BABA) (SIGMA-ALDRICH Chemistry, Catálogo A44207-5G) a una concentración de 100 μ M, de acuerdo a lo reportado por Martínez-Aguilar y colaboradores (2016).

4.5.2 Aplicación del Activador sintético

Se emplearon tres tiempos para la aplicación con BABA, la primera de ellas fue agregando 10 mL BABA 100 μ M durante la germinación (BABA 0dpg); la segunda forma fue por *drench* o riego, aplicando 50 mL de BABA 100 μ M en la base de cada planta sobre la vermiculita a los 10 dpg (BABA 10 dpg); y finalmente aplicando 20 mL de BABA 100 μ M por riego a los 3 dpg, tiempo en el cual se inoculó con *R. tropici*-GUS en las raíces (BABA 3 dpg) (Ver Figura 12).

La aplicación de un volumen de 50 mL de BABA [100 μ M] ya ha sido reportado Martínez-Aguilar y colaboradores (2016), sin embargo, debido al espacio en las camas de germinación empleadas éste volumen cubriría en su totalidad a las semillas, lo cual propiciaría una germinación lenta. Por lo que, el volumen fue disminuido a 10 mL conservando la misma concentración de aplicación.

4.6 Medios de cultivo para *Rhizobium tropici* CIAT 899-GUS

La cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 con GUS se creció en medio PY (Extracto Peptona-Levadura, SIGMA-ALDRICH, Catálogo # 77196) que contenía 20 μ g/mL Ácido nalidíxico, 50 μ g/mL Kanamicina y 7 mM CaCl₂ por 2-3 días a 28°C con agitación (200 r.p.m.), hasta obtener una concentración OD600 de 0.4-0.6 (Estrada-Navarrete, et al., 2007).

Tabla 4. Composición del medio PY

Ingredientes	Gramos/Litro
Glucosa	40.0
Peptona de soya	10.0
Cloranfenicol	0.05
Sulfato de estreptomina	0.03
Extracto de levadura	5.0
Agar	15
pH final 6.6 \pm 0.2 (a una temperatura de 25°C)	

4.6.1 Pre-inóculo de *R. tropici*-GUS

En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 15 mL de medio PY líquido, 52.5 µL de 2 M CaCl₂, 15 µL de 50 mg/mL kanamicina, 6 µL de 30 mg/mL ácido nalidíxico y 50 µL del stock de glicerol con la cepa *R. tropici*-GUS. Se incubó por 18-24 horas a 28°C con agitación (200 r.p.m). Así, la concentración final fue de 50 µg/mL Kanamicina, 20 µg/mL Ácido nalidíxico y 7 mM CaCl₂.

4.6.2 Inóculo de *R. tropici*-GUS

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 250 mL de medio PY líquido, 875 µL de 2 M CaCl₂, 250 µL de 50 mg/mL Kanamicina, 166 µL de 30 µg/mL Ácido nalidixico y 15 mL del pre-inóculo. Se dejó incubando por 18-24horas a 28°C con agitación (200 r.p.m).

4.6.3 Suspensión e inoculación con *R. tropici*-GUS

Se colocó el cultivo de *R. tropici*-GUS en tubos de centrifuga estériles y se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 5 min, a 4°C en una centrifuga marca Sorvall RC-58 utilizando el rotor JA-17, para la obtención de una pastilla bacteriana. Se descartó el sobrenadante y se realizó un ligero lavado con 5 mL de 10 mM MgSO₄. Cada pastilla se resuspendió en 10 mL de 10 mM MgSO₄.

Se midió la OD a 600 nm del inóculo en un espectrofotómetro, utilizando como blanco 1 mL de 10 mM MgSO₄ libre de bacterias y se realizaron diluciones seriales con 10 mM MgSO₄ para obtener una concentración de 5-8 × 10⁸ UFC mL⁻¹ en una OD de 0.4 a 0.6.

Las semillas germinadas a los 3 dpv fueron trasplantadas a macetas de 2.3 L con vermiculita estéril e inoculadas con 4 mL de la suspensión de *R. tropici*-GUS en MgSO₄, en 4 puntos equidistantes a las raíces. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 25-28°C con un fotoperiodo de 16 horas de día, 8 h de oscuridad y fueron regadas con solución nutritiva B&D sin KNO₃ (Broughton & Dilworth, 1971), una vez por semana, para aquellas plantas que fueron inoculadas con *R. tropici*. A su vez, las plantas que no fueron inoculadas con *R. tropici* fueron regadas con la solución de B&D con 8 mM KNO₃ y con agua destilada estéril una vez por semana.

4.7 Medios de cultivo para *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Se creció *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3212 (PspNPS3212) en medio KB (King's B, SIGMA-ALDRICH, Catálogo 60786) preparado con 50 µg/mL rifampicina y 6 mM MgSO₄, por 2-3 días a 28°C, con agitación (200 r.p.m), hasta obtener una OD₆₀₀ de 1.0.

Tabla 5. Composición del medio KB

Ingredientes	Gramos/Litro
Peptona combinada	20.0
Hidrogenofosfato de dipotasio	1.5
Sulfato de magnesio	1.5
Agar	1.0
pH final 7.2 ± 0.2 (a una temperatura de 25°C)	

4.7.1 Pre-inóculo de *P. syringae* pv. *phaseolicola*

En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 15 mL de KB líquido, 15 µL de 50mg/mL rifampicina, 90 µL de 1 M MgSO₄ y 50 µL del stock de glicerol de la cepa *P. syringae*. Se dejó incubando por 18-24 h a 28°C con agitación (200 r.p.m). Quedando en una concentración final de 50µg/mL rifampicina y 6 mM MgSO₄.

4.7.2 Inóculo de *P. syringae* pv. *phaseolicola*

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 250 mL de medio KB, 250 µL de 50mg/mL rifampicina, 1.5 mL de 1 M MgSO₄ y 5 mL del pre-inóculo. Se dejó incubando por 24-48 h a 28°C con agitación.

4.7.3 Suspensión e inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola*

Se colocó el cultivo de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en tubos de centrifuga estériles y se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 5 min a 4°C en una centrifuga marca Sorvall RC-58 utilizando el rotor JA-17. Una vez formada la pastilla bacteriana, se descartó el sobrenadante y se realizó un ligero lavado con 5 mL de 10 mM MgCl₂. La pastilla se resuspendió en 10 mL de 10 mM MgCl₂.

Se midió la OD₆₀₀ en un espectrofotometro, utilizando como blanco 1 mL de 10 mM MgCl₂ libre de bacterias. Se realizaron diversas diluciones con 10 mM MgCl₂ para obtener una concentración de 1 × 10⁷ UFC mL⁻¹.

Se generó una resuspensión bacteriana con 10 mM MgCl₂, además se agregaron 100µL de Silwet L-77 (LEHLE SEEDS, Catalogo VIS-01), para un volumen de 200 mL. La inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola* se realizó a los 17 dpq por medio de la inmersión del primer trifolio durante 30 segundos.

4.8 Diseño experimental y tomas de muestras

Se utilizaron 3 modelos experimentales en tiempos distintos para la aplicación del activador BABA [100 µM]. El nombre de cada uno de los tratamientos se etiquetó de

acuerdo a la edad biológica en la cual se agregó BABA, como se muestra en la siguiente figura (Figura 11).

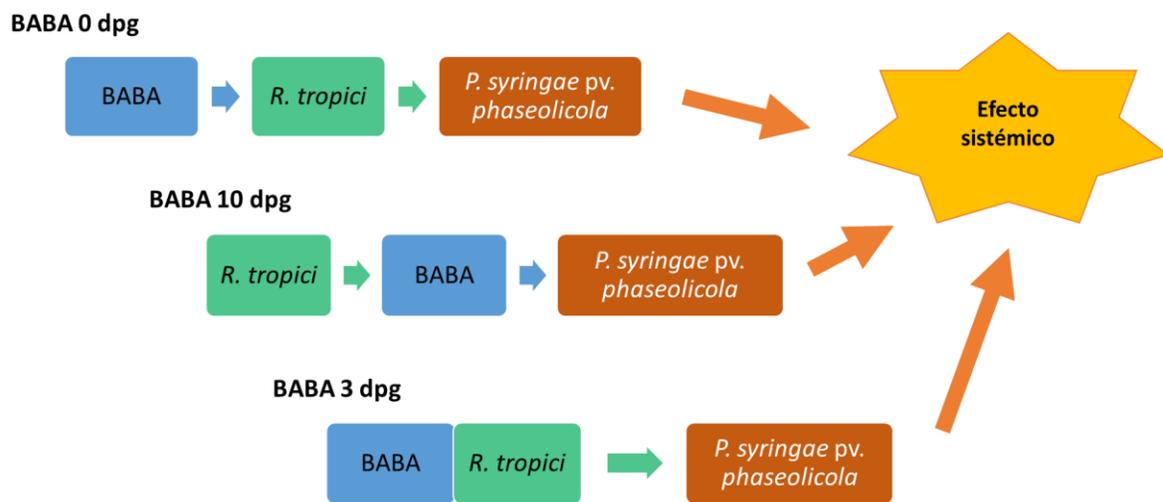


Figura 11. Modelos de los tiempos de aplicación de BABA y su combinación con *R. tropici*-GUS, así como de la aplicación del patógeno *P. syringae pv. phaseolicola* para el análisis del efecto sistémico.

A continuación se describe de manera detallada cada uno de los modelos utilizados durante este proyecto.

4.8.1 BABA 0 dpg

En el primer modelo nombrado como "BABA 0 dpg", la aplicación de BABA 100 μ M se realizó durante la germinación de las semillas de frijol. Posteriormente, a los 3 dpg, se inoculó con *R. tropici*-GUS, para finalmente exponer las plantas con el patógeno *P. syringae pv. phaseolicola* a los 17 dpg (Figura 12A).

4.8.2 BABA 10 dpg

En este segundo modelo se inoculó con *R. tropici*-GUS, a los 3 dpg. Posteriormente, a los 10 dpg, se regó con 50 mL de BABA 100 μ M y a los 17 dpg se infectó con *P. syringae pv. phaseolicola* (Figura 12B).

4.8.3 BABA 3 dpg

En el último modelo, se realizó una aplicación simultánea de *R. tropici*-GUS y BABA 100 μ M a los 3 dpg. A los 17 dpg se infectaron las plantas con *P. syringae pv. phaseolicola* (Figura 12C).

En los tres modelos se respetó el tiempo de aplicación de *R. tropici*-GUS a los 3 dpg y de *P.syringae* pv. *phaseolicola* a los 17 dpg, así como de sus concentraciones. Las concentraciones empleadas para *R. tropici*-GUS fue de $5-8 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ y para *P.syringae* pv. *phaseolicola* de 1×10^7 UFC mL⁻¹. Además, la evaluación del efecto sistémico se realizó con la toma de muestra del segundo trifolio, ya que la aplicación del patógeno se realizó en el primer trifolio (considerando esta hoja trifoliada como la hoja infectada o local).

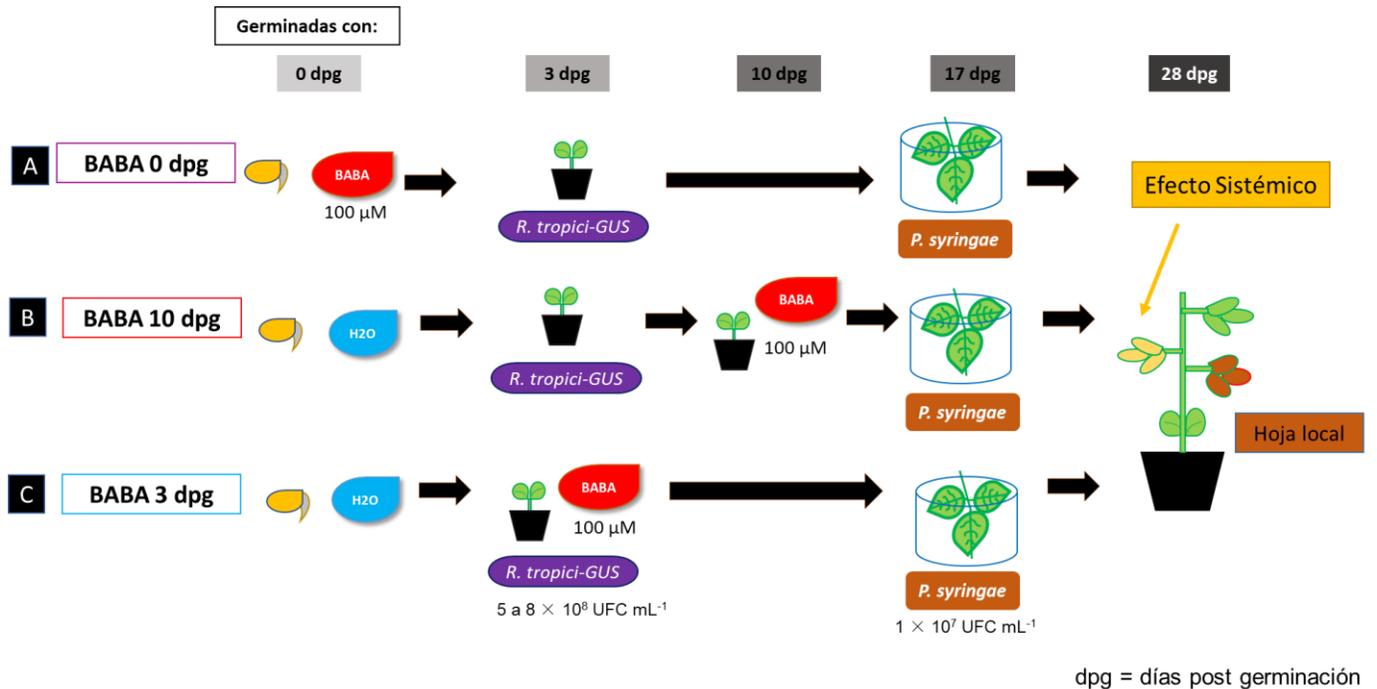


Figura 12. Descripción de los tiempos de aplicación de BABA, *R. tropici*-GUS y *P.syringae* pv. *phaseolicola* en los tres modelos. **A.** BABA 0 dpg, aplicación de 100μM BABA durante la germinación. **B.** BABA 10 dpg, aplicación de 100μM BABA por riego a los 10 dpg. **C.** BABA 3 dpg, aplicación simultánea de 100μM BABA y *R. tropici*-GUS a los 3dpg. La aplicación de *R. tropici*-GUS fue a los 3 dpg y *P.syringae* pv. *phaseolicola* a los 17 dpg, permaneció constante en todos los tratamientos. Se realizó el análisis del efecto sistémico a los 28 dpg en el segundo trifolio, al considerar el primer trifolio como la hoja donde se generó la respuesta local a la infección por el patógeno.

4.8.4 Tratamientos

Los nombres colocados en los tratamientos fueron designados de acuerdo a la letra inicial de cada uno de los factores empleados (BABA, R. *tropici*-GUS y P.*syringae* pv. *phaseolicola*). Es decir, si se utilizó BABA en algún tratamiento, este contaría con una “B”. Cuando alguno de estos tratamientos no contaba con alguno de los tres factores empleados, entonces se colocaba una “N” de null o nulo.



Figura 13. Definición de los factores empleados en cada uno de los tratamientos. Se colocó la primera letra inicial de cada uno de los factores cuando estos se encontraban presentes y una N cuando no se utilizaba. B= BABA, R= *R. tropici*-GUS, P= *P.syringae* pv. *phaseolicola* y N=null o nada.

El nombre empleado en el tratamiento de BABA 10 dpg cuando se utilizó BABA y *R. tropici*-GUS, se colocó de manera invertida, debido a que primero se aplicó *R. tropici*-GUS antes que BABA. Por lo que en lugar de encontrarse como en BABA 0 dpg BRN o BRP, se encuentra como RBN o RBP, la P es por la aplicación de *P.syringae* pv. *phaseolicola*.

Se emplearon los siguientes tratamientos: 4 tratamientos controles, 4 tratamientos dentro de BABA 0 dpg y BABA 10 dpg; y 2 tratamientos en BABA 3 dpg (Tabla 6), con tres plantas en cada uno para el análisis de los síntomas, considerando cada planta como una replica biológica en cada toma de muestra.

Tabla 6. Diseño experimental global.

Controles	BABA 0 dpg	BABA 10 dpg	BABA 3 dpg
NNN	BNN	BNN	BRN
NRN	BRN	RBN	BRP
NNP	BRP	RBP	
NRP	BNP	BNP	

En las tablas 7 a 10 se describe de manera detallada la forma en que se llevó a cabo cada uno de los tratamientos, así como su tiempo de aplicación.

Tabla 7. Diseño experimental para los controles.

Controles	
Tratamientos	Descripción
NNN	Plantas germinadas con agua (sin tratamientos).
NRN	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpg.
NNP	Plantas germinadas con agua, infectadas con <i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i> a los 17 dpg.

NRP	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpj e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.
-----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabla 8. Diseño experimental para BABA 0 dpj.

BABA 0 dpj	
Tratamientos	Descripción
BNN	Plantas germinadas con 100 µM de BABA.
BRN	Plantas germinadas con 100 µM de BABA e inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpj.
BNP	Plantas germinadas con 100 µM de BABA e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.
BRP	Plantas germinadas con 100 µM de BABA, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpj e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.

Tabla 9. Diseño experimental para BABA 10 dpj.

BABA 10 dpj	
Tratamiento	Descripción
BNN	Plantas germinadas con agua y regadas a los 10 dpj con 100 µM de BABA.
RBN	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpj y regadas a los 10 dpj con 100 µM de BABA.
BNP	Plantas germinadas con agua, regadas a los 10 dpj con 100 µM de BABA e infectadas con el <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.
RBP	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS a los 3 dpj, regadas a los 10 dpj con 100 µM de BABA e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.

Tabla 10. Diseño experimental para BABA 3 dpj.

BABA 3 dpj	
Tratamiento	Descripción
{BR}N	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS y regadas con 100 µM de BABA a los 3 dpj.
{BR}P	Plantas germinadas con agua, inoculadas con <i>R. tropici</i> -GUS y regadas con 100 µM de BABA a los 3 dpj, e infectadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a los 17 dpj.

4.8.5 Tomas de muestras

Las tomas de muestras se realizaron de manera general a las 24 h antes y 24 horas después de agregar BABA y de inocular *R. tropici*-GUS. Así como 24 h antes, y 24, 72 y 120 h después de infectar con *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Además, cabe aclarar que se colocaron los tratamientos controles en cada uno de los modelos o experimentos, ya que se fueron realizando de manera desfasada. Fue muy importante evitar cualquier factor externo que pudiera afectar a nuestros experimentos, para ello comparamos entre los diferentes controles colocados en cada tiempo.

A continuación se describe de manera específica en qué momento se realizó la toma de muestras en cada modelo y qué tejidos fueron recolectados en cada toma.

4.8.5.1 BABA 0 dpj

Se realizaron 6 tomas de muestras (Figura 14). En la primera de ellas correspondiente a los 3 dpj antes de inocular con *R. tropici*-GUS, se dividieron las muestras en raíces y parte aérea (cotiledón y hojas verdaderas). Esta toma fue considerada como “después de BABA” (DB) y “antes de *R. tropici*-GUS” (AR). En la segunda toma, 24 horas después de inocular las plantas de frijol con *R. tropici*-GUS (DR), se colectaron de igual manera las raíces y la parte aérea.

En los siguientes muestreos se recolectaron las raíces, nódulos y hojas distales o sistémicas, de la segunda a la cuarta hoja trifoliada sin considerar las hojas tratadas con *P. syringae* pv. *phaseolicola*, ni expuesta a BABA. Los tiempos a considerar fueron 24 horas antes de la infección con el patógeno (AP), y 24, 72 y 120 h después del patógeno (1DP, 3DP y 5DP, respectivamente).

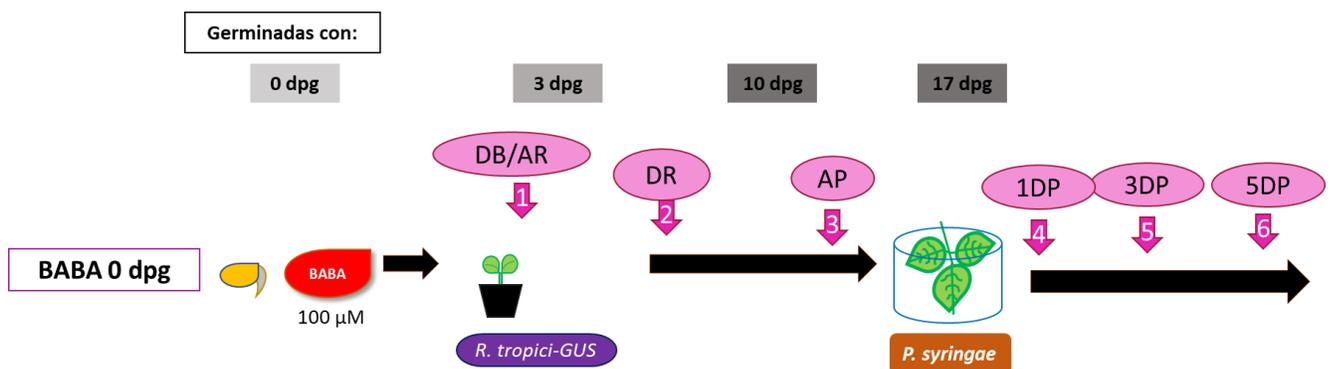


Figura 14. Tomas de muestras para el modelo BABA 0 dpj. Se realizaron 5 tomas de muestras, **1)** Después de aplicar BABA y antes de inocular con *R. tropici*-GUS (DB/AR). **2)** 24 h después de inocular con *R. tropici*-GUS (DR). **3)** 24 h antes de infectar a las plantas con *P. syringae* pv *phaseolicola* (AP). **4)** 24 h o 1 día después de haber inoculado

con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **5)** 72 h 3 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **6)** 120 h o 5 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*.

El número total de plantas necesarias para las tomas de muestras en este modelo fue de 102 plantas, en donde se involucró la incorporación de los controles. En la Figura 15 se ilustra la edad biológica en la cual se realizó la recolección y el número de tratamientos que se recolectaron por cada toma, tomando en cuenta que por cada toma de muestra se retiraban 3 plantas del tratamiento.

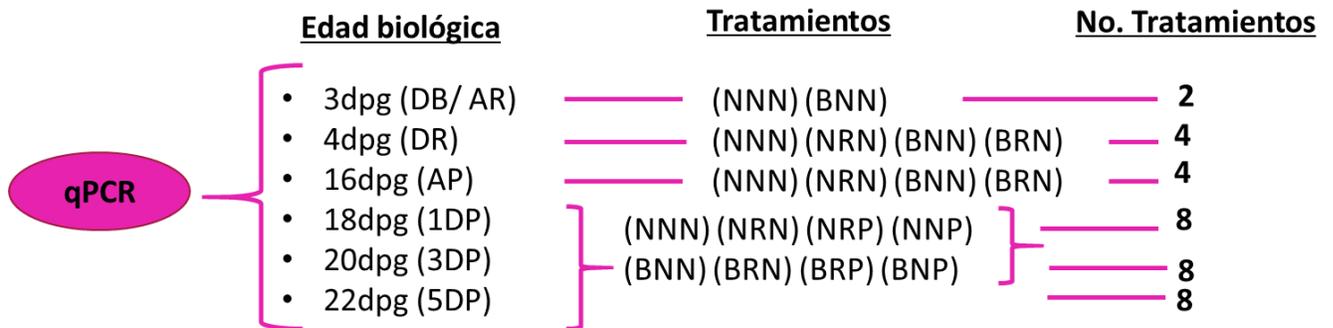


Figura 15. Especificación del número de tratamientos analizados y edades biológicas por cada toma de muestra para BABA 0 dpg. La primera toma a los 3 dpg, se recolectó el tratamiento control (sin ninguno de los factores, NNN) y las semillas germinadas con BABA (BNN). En la segunda toma, 4 dpg, a las 24 h después de inocular con *R. tropici-GUS*. En la tercera toma, 24 h antes de infectar con *P. syringae* pv *phaseolicola*. Cuarta, quinta y sexta toma, 1DP, 3DP y 5DP, en esta edad las plantas ya han ido inoculadas con el patógeno.

4.8.5.2 BABA 10 dpg

Se realizaron 8 tomas de muestras, la primera de ellas a los 3 dpg antes de inocular con *R. tropici-GUS* (AR). Se recolectaron las raíces y parte aérea. A las 24 h después de haber inoculado con *R. tropici-GUS* (DR), se recolectaron las raíces y la parte aérea (Figura 16).

En las posteriores tomas de muestras se recolectaron las raíces, nódulos y hojas sistémicas, considerando 24 h antes y 24 h después de regar con BABA, así como 24 h antes de la infección con el patógeno (AP), 24, 72 y 120 h después del patógeno (1DP, 3DP y 5DP, respectivamente).

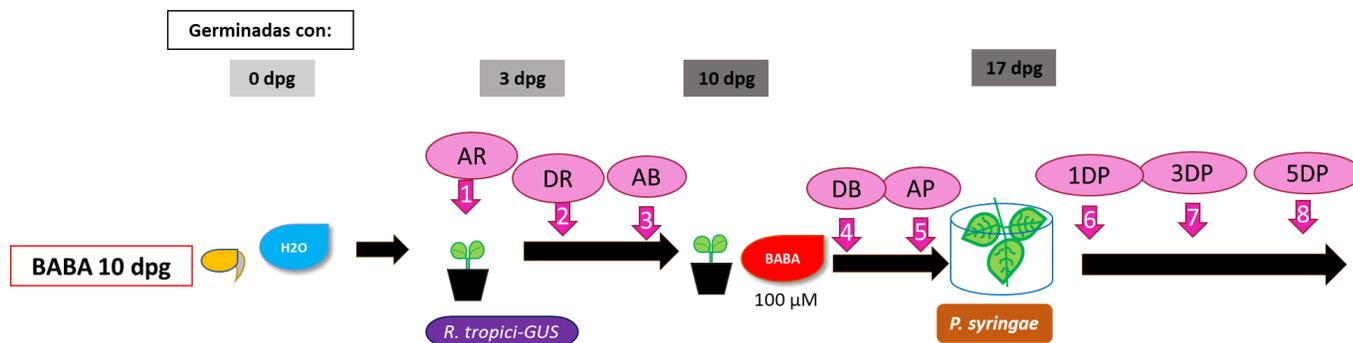


Figura 16. Tomas de muestras para el modelo BABA 10 dpg. **1)** Antes de inocular con *R. tropici-GUS* (AR). **2)** 24 h después de inocular con *R. tropici-GUS* (DR). **3)** 24 h antes de regar con BABA. **4)** 24 h después de regar con BABA. **5)** 24 h antes de infectar a las plantas con *P. syringae* pv *phaseolicola* (AP). **6)** 24 h o 1 día después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **7)** 72 h o 3 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **8)** 120 h o 5 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*.

Para BABA 10 dpg se utilizaron 111 plantas, contando las 3 repeticiones biológicas de cada tratamiento y colecta. De igual manera, se incorporaron los controles (sin la aplicación de BABA). En la Figura 17 se indica de manera específica la edad biológica y número de tratamientos recolectados en cada toma.

Edad biológica	Tratamientos	No. Tratamientos
• 3dpg (AR)	_____ (NNN)	_____ 1
• 4dpg (DR)	_____ (NNN) (NRN)	_____ 2
• 9dpg (AB)	_____ (NNN) (NRN)	_____ 2
• 11dpg (DB)	_____ (NNN) (NRN) (BNN) (BRN)	_____ 4
• 16dpg (AP)	_____ (NNN) (NRN) (BNN) (BRN)	_____ 4
• 18dpg (1DP)	} (NNN) (NRN) (NRP) (NNP) (BNN) (BRN) (BRP) (BNP) }	_____ 8
• 20dpg (3DP)		_____ 8
• 22dpg (5DP)		_____ 8

Figura 17. Especificación del número de tratamientos recolectados y edades biológicas por cada toma de muestra para BABA 10 dpg. La primera muestra a los 3 dpg, se recolectó antes de inocular con *R. tropici-GUS*, es decir, recolectando el tratamiento control sin ningún factor (NNN). La segunda toma, 4 dpg (DR), a las 24 h después de inocular con *R. tropici-GUS*. La tercera toma, a los 9 dpg correspondiente a 24 h antes del riego con BABA. Cuarta toma, 24 h después del riego con BABA. La quinta toma, a los 16 dpg, 24 h antes de infectar con *P. syringae* pv *phaseolicola*. Sexta, séptima y octava toma, 1DP, 3DP y 5DP. A estas edades, las plantas ya han ido inoculadas con el patógeno.

4.8.5.3 BABA 3 dpq

Se realizaron 6 tomas de muestras, la primera de ellas a los 3 dpq, antes de inocular con *R. tropici*-GUS (AR) y antes de realizar el riego de BABA (AB). Se recolectaron las raíces y parte aérea. A las 24 h después de haber inoculado con *R. tropici*-GUS (DR) y después de regar con BABA (DB), se recolectaron las raíces y la parte aérea.

En las posteriores tomas de muestras se recolectaron las raíces, nódulos y hojas distales o sistémicas, 24 h antes de la infección con el patógeno (AP), 24, 72 y 120 horas después del patógeno (1DP, 3DP y 5DP, respectivamente). Retirando 3 plantas de cada tratamiento por cada toma.

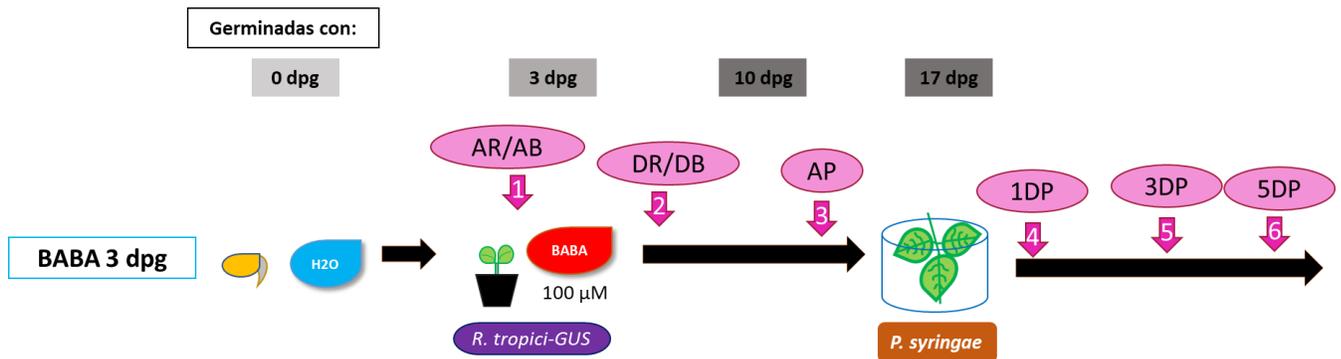


Figura 18. Tomas de muestras para el modelo BABA 3 dpq. **1)** Antes de inocular con *R. tropici*-GUS (AR) y antes de regar con BABA (AB). **2)** 24 h después de inocular con *R. tropici*-GUS (DR) y después de regar con BABA (DB). **3)** 24 h antes de infectar a las plantas con *P. syringae* pv *phaseolicola* (AP). **4)** 24 h o 1 día después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **5)** 72 h o 3 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*. **6)** 120 h o 5 días después de haber inoculado con *P. syringae* pv *phaseolicola*.

En el último modelo de BABA 3 dpq, se utilizaron 75 plantas, contando las 3 repeticiones biológicas de cada tratamiento y toma. De igual manera, se incorporaron los controles (sin la aplicación de BABA). En la Figura 19 se señala de manera específica la edad biológica y número de tratamientos recolectados en cada toma.

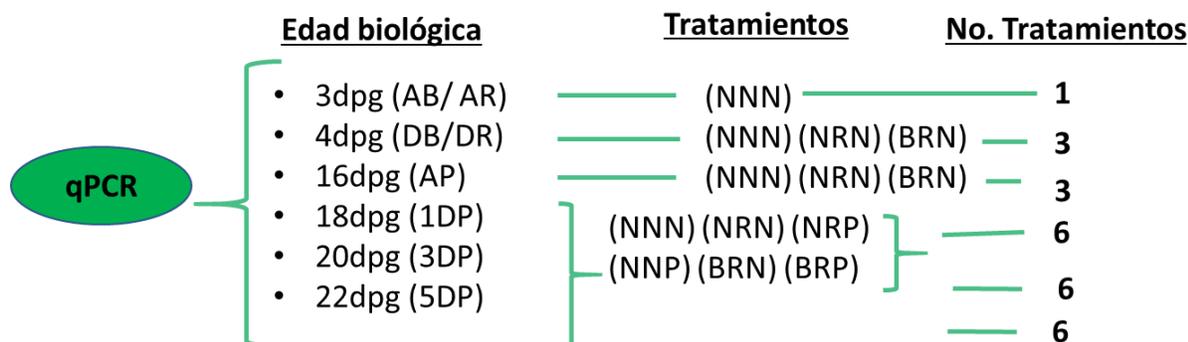


Figura 19. Especificación del número de tratamientos recolectados y edades biológicas por cada toma de muestra para BABA 3 dpg. La primera muestra a los 3 dpg, se recolectó antes de regar con BABA e inocular con *R. tropici*-GUS, recolectando el tratamiento control sin ningún factor (NNN). La segunda toma, 4 dpg, a las 24 h después de haber regado con BABA e inoculado con *R. tropici*-GUS. La tercera toma, a los 16 dpg correspondiente a las 24 h antes de infectar con *P. syringae* pv *phaseolicola*. Cuarta, quinta y sexta toma, 1DP, 3DP y 5DP, de plantas inoculadas con el patógeno.

4.8.6 Distribución del número de plantas

El número de plantas en cada modelo dependió del contenido de tratamientos, número de tomas de muestra, análisis fenotípicos, pruebas de fijación de nitrógeno y costo-beneficio del priming durante la floración. A continuación, se describe de manera detallada la distribución de las plantas para cada modelo.

BABA 0 dpg

Para el primero modelo “BABA 0 dpg”, se utilizaron un total de 162 plantas, distribuidas en 102 plantas para qPCR con 6 tomas de muestra distribuidas en 34 tratamientos en total con 3 réplicas biológicas por cada una (Figura 20). Para el análisis fenotípico de la infección por *P. syringae* pv *phaseolicola*, se analizaron 3 plantas de los 4 tratamientos de BABA 0 dpg (BNN, BRN, BRP, BNP) y 4 tratamientos de controles (NNN, NRN, NRP, NNP).

Para la fijación de nitrógeno, se analizaron solo las plantas inoculadas con *R. tropici*-GUS, contando con 2 tratamientos de BABA 0 dpg (BRN y BRP) y 2 tratamientos de controles (NRN y NRP), con 3 plantas por cada tratamiento. Y, finalmente, para el análisis del costo-beneficio del *priming* durante la floración, se analizó la generación de flores y vainas en 3 plantas de cada tratamiento; contando con un total de 8 tratamientos, 4 tratamientos de BABA 0dpg y 4 de controles.

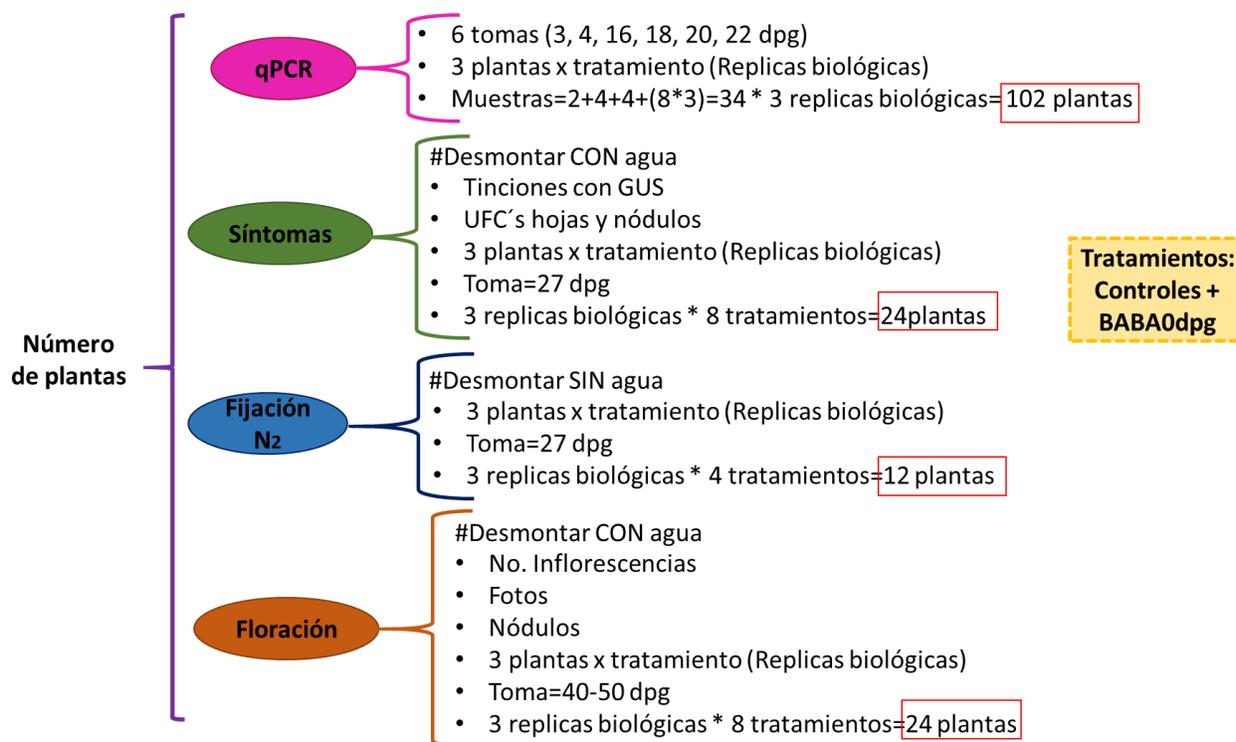


Figura 20. Desglose del número total de plantas contenidas en el tratamiento BABA 0 dpg. Para el primero modelo BABA 0 dpg, se ocuparon un total de 162 plantas, distribuidas de la siguiente manera: 102 plantas sólo para tomas de muestras, 24 plantas para observar los síntomas de infección por *P. syringae* pv *phaseolicola* a los 27dpg, 12 para evaluar la fijación de nitrógeno y 24 para analizar el costo-beneficio del *priming* durante la floración. Dentro del número total se consideraron los controles, en donde no se aplicó BABA.

BABA 10 dpg

En el segundo modelo “BABA 10 dpg”, se utilizaron un total de 171 plantas, distribuidas en 111 plantas para qPCR con 7 tomas de muestra distribuidas en 29 tratamientos en total, con 3 réplicas biológicas en cada uno (Figura 21). Para el análisis fenotípico de la infección por *P. syringae* pv *phaseolicola*, se analizaron 3 plantas de los 4 tratamientos de BABA 10 dpg (BNN, RBN, RBP, BNP) y 4 tratamientos de controles (NNN, NRN, NRP, NNP).

Para la fijación de nitrógeno, se analizaron solo las plantas inoculadas con *R. tropici*-GUS, contando con 2 tratamientos de BABA 10 dpg (RBN y RBP) y 2 tratamientos de controles (NRN y NRP), empleando 3 plantas de cada tratamiento. Finalmente, para el análisis del costo-beneficio del *priming* durante la floración, se utilizaron 3 plantas de cada tratamiento, contando con un total de 8 tratamientos.

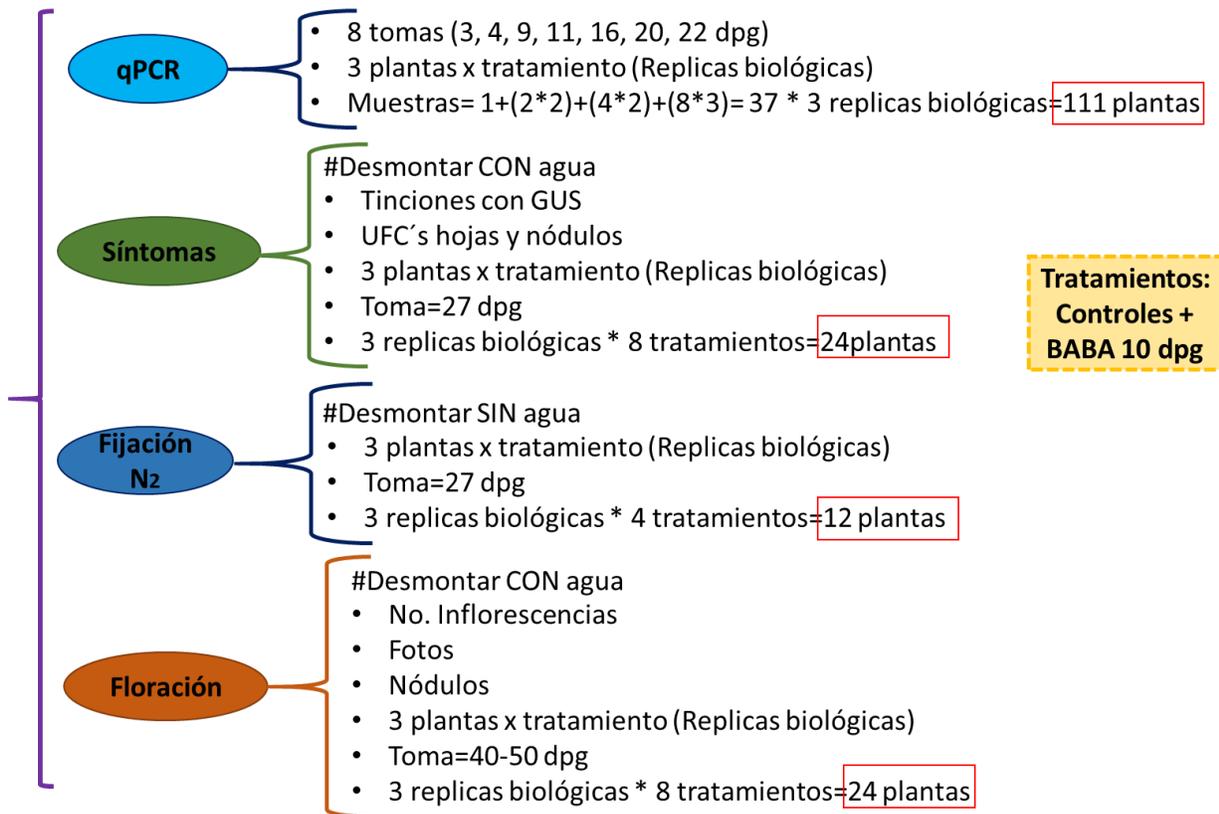


Figura 21. Desglose del número total de plantas contenidas en el tratamiento BABA 0 dpg. Para el segundo modelo BABA 10 dpg, se ocuparon un total de 171 plantas, distribuidas en 111 para qPCR, 24 para observar los síntomas de infección por *P. syringae* pv *phaseolicola* a los 27dpg, 12 para evaluar la fijación de nitrógeno y 24 para analizar el costo-beneficio del *priming* durante la floración. Dentro de este esquema se consideraron los controles, en donde no se aplicó BABA.

BABA 3 dpg

En el tercer modelo “BABA 3 dpg”, se utilizaron un total de 123 plantas, distribuidas en 75 plantas para qPCR con 5 tomas de muestra distribuidas en 19 tratamientos en total con 3 réplicas biológicas por cada una (Figura 22). Para el análisis fenotípico de la infección por *P. syringae* pv *phaseolicola*, se analizaron 3 plantas de los 2 tratamientos de BABA 3 dpg ({BR}N y {BR}P) y 4 tratamientos de controles (NNN, NRN, NRP, NNP).

Para la fijación de nitrógeno, se analizaron solo las plantas inoculadas con *R. tropici*-GUS, contando con 2 tratamientos de BABA 3 dpg ({BR}N y {BR}P) y 2 tratamientos de controles (NRN y NRP), contando con 3 plantas de cada tratamiento. Finalmente, para el análisis del costo-beneficio del *priming* durante la floración, se utilizaron 3 plantas de cada tratamiento, contando con un total de 6 tratamientos.

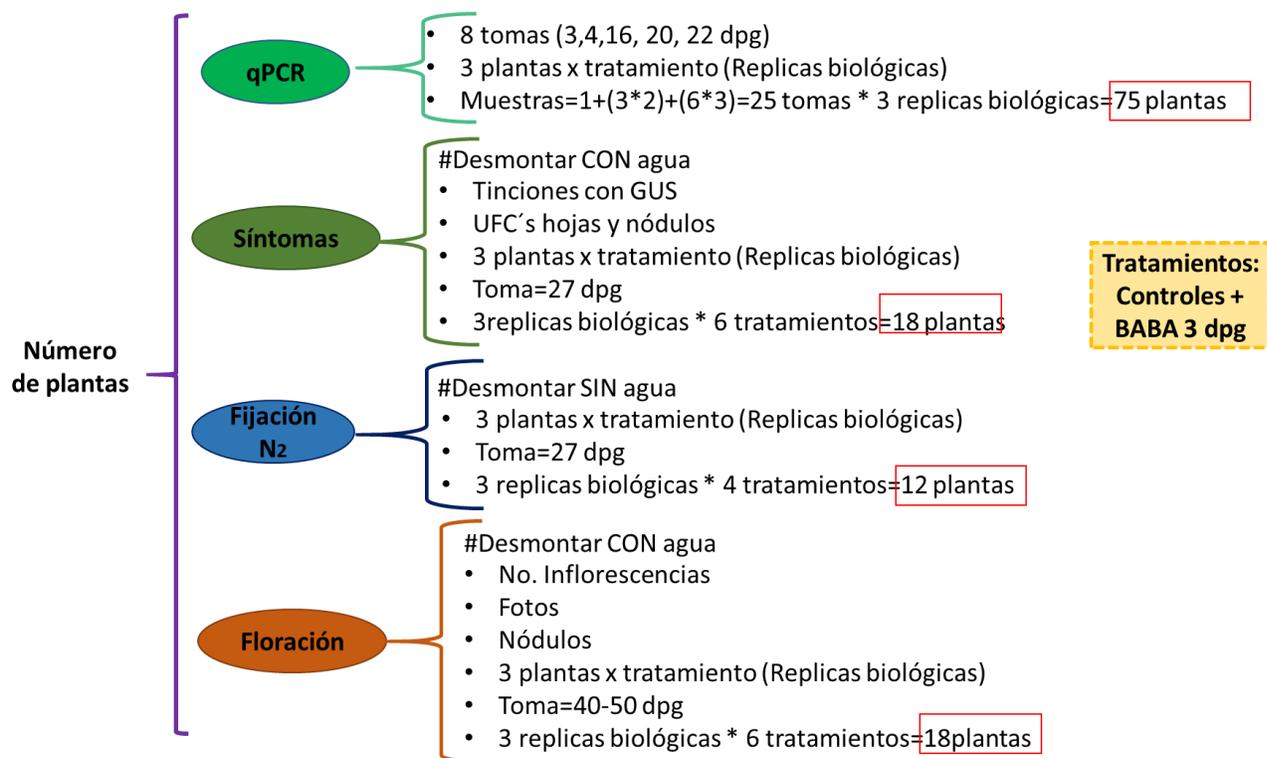


Figura 22. Desglose del número total de plantas contenidas en el tratamiento BABA 0 dpq. Para el tercer modelo BABA 3 dpq, se usó un total de 123 plantas, distribuidas en 75 para qPCR, 18 para observar los síntomas de infección por *P. syringae* pv *phaseolicola* a los 27 dpq, 12 para evaluar la fijación de nitrógeno y 18 para analizar el costo-beneficio del *priming* durante la floración. Dentro de este esquema se consideraron los controles, en donde no se aplicó BABA.

4.9 Análisis fenotípico

4.9.1 Efecto en la germinación con BABA en las raíces

Se analizó el efecto del activador sintético BABA durante la germinación, evaluando el tamaño de la raíz principal, tamaño del hipocótilo y número de raíces secundarias a los 3dpq. Los resultados obtenidos se compararon con plántulas germinadas con agua destilada estéril, crecidas en las mismas condiciones.

4.9.2 Medición de altura

Se realizó la medición de las alturas desde el inicio de la base de la planta hasta el meristemo apical de las plantas.

4.9.3 Medición de radícula

Se midió el largo de la raíz principal de las plantas a los 3, 28 y 44 dpq.

4.9.4 Peso fresco

Se pesó la parte aérea y la radícula completa de las plantas a los 28 y 44 dpv.

4.9.5 Porcentaje de daño en hojas

Mediante el uso del software Fiji (Schindelin, et al., 2012) se midieron las hojas infectadas con el patógeno a los 11 días después de la infección con *P. syringae* pv. *phaseolicola* o 28 dpv, tomándose la hoja trifoliada como el 100%. Posteriormente, se delimitó el área necrótica y clorótica, considerando ambas como el porcentaje de daño foliar.

4.9.6 Conteo de nódulos

Se contaron los nódulos maduros (color rojizo) y los pseudonódulos (sin color) de las plantas de 28 dpv. Para esto se colocaron las plantas en una caja Petri en presencia de agua, evitando la deshidratación de las raíces. La maduración de los nódulos es considerada a partir de los 24 dpv. En nuestro caso, se optó por elegir la toma a los 28 dpv para comparar entre los distintos tratamientos el efecto sistémico generado. Además, a los 28 dpv también se analizó el porcentaje de daño generado por *P. syringae* en el primer trifolio.

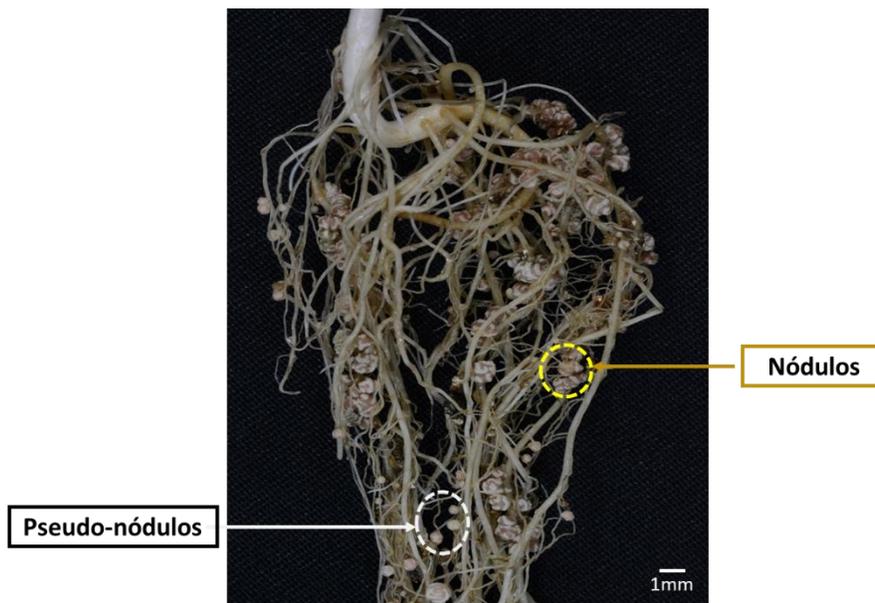


Figura 23. Distribución de nódulos y pseudonódulos en las raíces de plantas de frijol (Foto tomada para éste trabajo por A. Cisneros).

4.9.7 Mediciones del diámetro de nódulos

Se determinó el diámetro de los nódulos a los 28 dpv de los tratamientos donde se inoculó *R. tropici*-GUS, es decir, BABA 0 dpv (BRN y BRP), BABA 10 dpv (RBN y RBP), BABA

3 dpg (N y P) y de los controles (NRN y NRP). Para ello se tomaron fotografías a 155 nódulos de cada tratamiento utilizando el microscopio estereoscópico LEICA EZ4D (con cámara digital integrada) a una magnificación de 8 X. Utilizando el programa de LEICA EZ se ajustó la fotografía a una exposición de 118.5 ms, ganancia de 5.0 X, gamma de 1.00 y una saturación de 91.0. Mediante el software Fiji se midió el diámetro de los nódulos en milímetros, obteniendo finalmente un promedio por tratamiento.

4.9.8 Unidades formadoras de colonias (UFC)

4.9.8.1 UFC de *P. syringae* pv *phaseolicola* de hojas infectadas

Se tomaron 3 discos de 1 cm² de cada foliolo, con un sacabocado, y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Esta toma se realizó adyacente a la zona de infección en hojas de 28 dpg. Se lavaron con 1 mL de agua destilada estéril y se colocaron durante 3 min en una solución de 1% hipoclorito de sodio (v/v). Posteriormente, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y finalmente se maceraron con 1 mL de 10 mM MgCl₂ con ayuda de un pistilo estéril.

Se realizaron 3 diluciones seriadas (1:10 o 10⁻¹, 1:100 o 10⁻² y 1:1000 o 10⁻³), partiendo del primer tubo (10⁰) que contenía la muestra de hoja molida. Tomando 100 µL del primer tubo y colocandoló en el siguiente tubo que contenía 900 µL de 10 mM MgCl₂, considerando esta primera dilución como 10⁻¹. Sucesivamente, se fueron tomando 100 µL, para las siguientes diluciones (10⁻² y 10⁻³).

En una caja Petri con medio KB sólido adicionado con 6 mM MgCl₂ y 50 µg/mL Rifampicina, se colocó una alícuota de 40 µL de una de las diluciones, teniendo 3 réplicas técnicas por cada dilución en cajas. Las cajas se incubaron por 36 horas a 28°C. Se contaron las colonias presentes por medio de un contador de placa (Darkfield Quebec, Colony counter American optical, Catálogo 3327) (Figura 24).

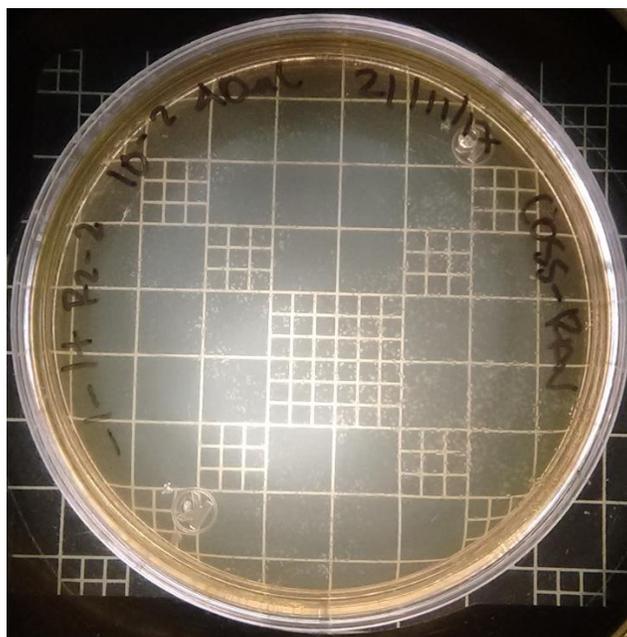


Figura 24. Colonias de *P. syringae* pv *phaseolicola* en medio KB adicionado con antibióticos sobre el contador de colonias con cuadrantes. Las colonias obtenidas de *P. syringae* pv *phaseolicola* en medio KB son transparentes y pequeñas, por lo que es necesaria una buena iluminación.

4.9.8.2 UFC de *R. tropici*-GUS de nódulos maduros

Se recolectaron a los 28 dpv, 3 nódulos de cada tratamiento, colocándolos en un tubo eppendorf separando por tratamiento. Se desinfectaron en 1% de hipoclorito de sodio (v/v) por 10 min. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y finalmente se maceraron con 1 mL de 10 mM MgSO₄ con ayuda de un pistilo estéril.

Se realizaron diluciones seriales partiendo de 100 µL del primer tubo con los nódulos macerados, para pasarlo a un segundo tubo con 900 µL de 10 mM MgSO₄, considerando esta primera dilución como 1:10 o 10⁻¹. Se continuaron las diluciones hasta 10⁻⁸.

Para conocer la dilución que presentará una mayor dispersión de colonias, se colocó en una caja con medio PY, adicionado con ácido nalidíxico 20 µg/mL, 20 µL de cada una de las diluciones, cuidando que no estuvieran en contacto con las otras diluciones. Las placas se incubaron por 36 horas a 28°C (Figura 25).

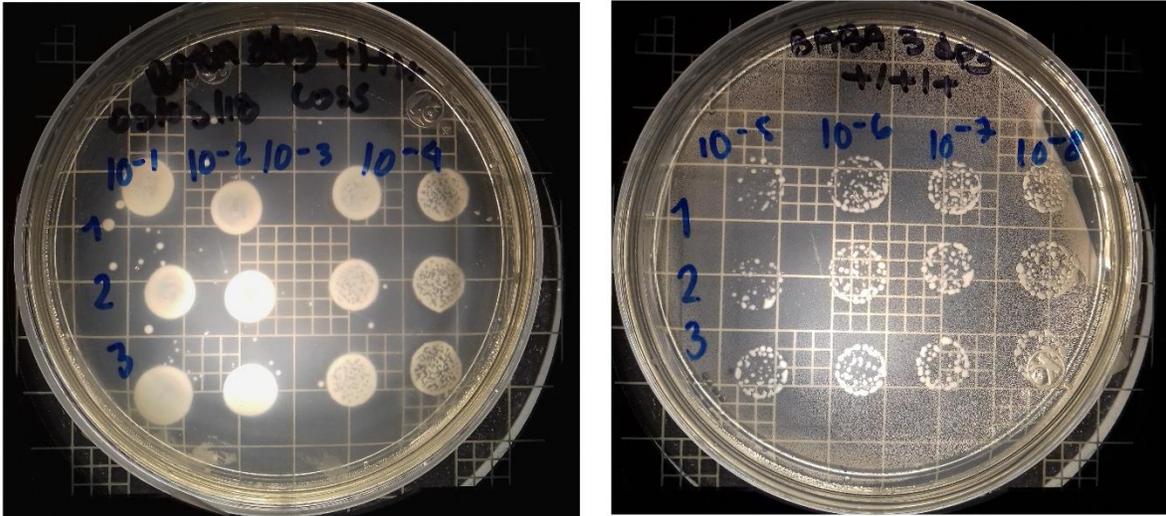


Figura 25. Inoculación de *R. tropici*-GUS en medio PY adicionado con ácido nalidixico a distintas diluciones (10^0 - 10^{-8}). Las colonias de *R. tropici*-GUS presentan una coloración blanca en el medio PY.

La dilución con un menor número de colonias se seleccionó y se plaquearon 20 μ L por triplicado en cajas individuales de PY con ácido nalidixico (20 μ g/mL). Para posteriormente, realizar el conteo de las colonias por medio de un contador de placa (Darkfield Quebec, Colony counter American optical, Catálogo 3327).

4.10 Fijación biológica de nitrógeno

El cálculo de la fijación de nitrógeno en nódulos maduros y frescos se realizó en el laboratorio del Dr. Juan José Peña Cabriales (Cinvestav, Unidad Irapuato), empleando para su análisis nódulos con una edad de 28 ddg, mediante la reducción de acetileno (Vessey, 1994) (Figura 26). Para este análisis, se separó la parte aérea de las raíces y se pesó la masa fresca de las raíces con los nódulos. Posteriormente, se colocaron (raíces con nódulos) en un frasco de vidrio con tapa de rosca. Se removió con una jeringa el 10% del aire contenido en el frasco y se sustituyó el mismo volumen retirado con acetileno (este volumen en mL o cm^3 , depende de las dimensiones del recipiente). Se calculó el volumen del recipiente con base en la fórmula de un cilindro (Ec. 1).

$$V = h\pi r^2 \quad \text{Ec. 1}$$

Se considero altura de 9 cm y un radio de 2.75 cm, obteniendo un volumen total de 213.82 cm^3 que equivale a 213.82 mL. Por lo que el 10% del volumen es 21 mL, pero por cuestiones técnicas de la recolección se consideraron 20 mL.

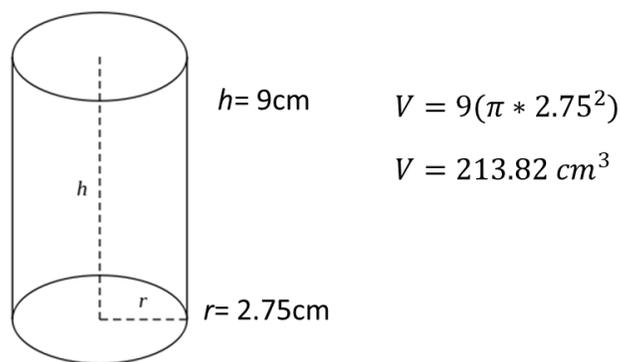


Figura 26. Cálculo del volumen del recipiente para reducción de acetileno.

Se incubaron las muestras durante 1 h a temperatura y presión constantes. Una vez transcurrida la hora de incubación, se recolectó el gas contenido en el frasco con un tubo rojo BD Vacutainer®. Las muestras gaseosas se almacenaron a temperatura y presión constante hasta el análisis en el Cromatógrafo de gases (CG). Por otra parte, se extrajeron los nódulos maduros de las raíces procesadas en éste análisis, para determinar el peso fresco (Figura 27).

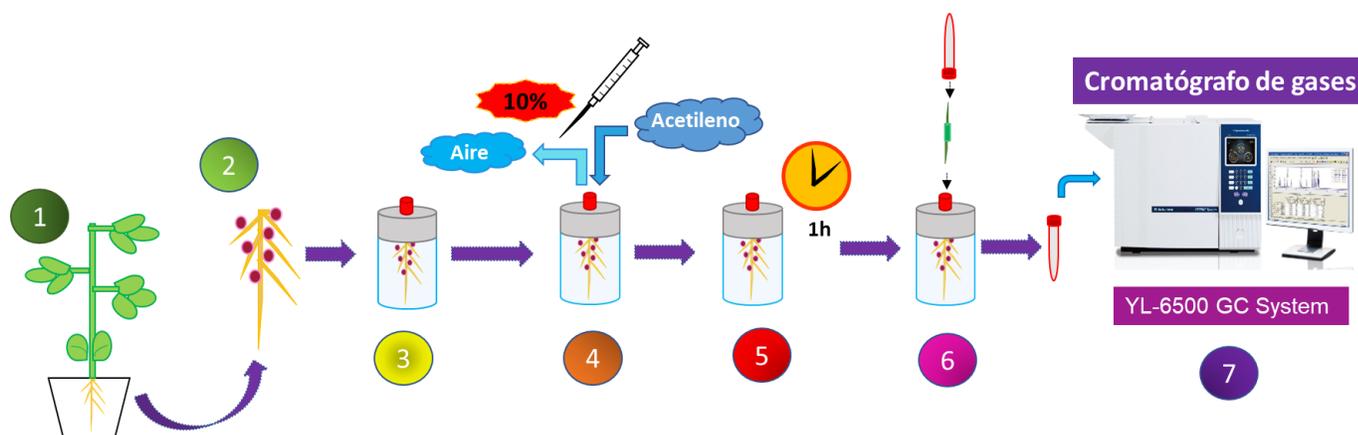


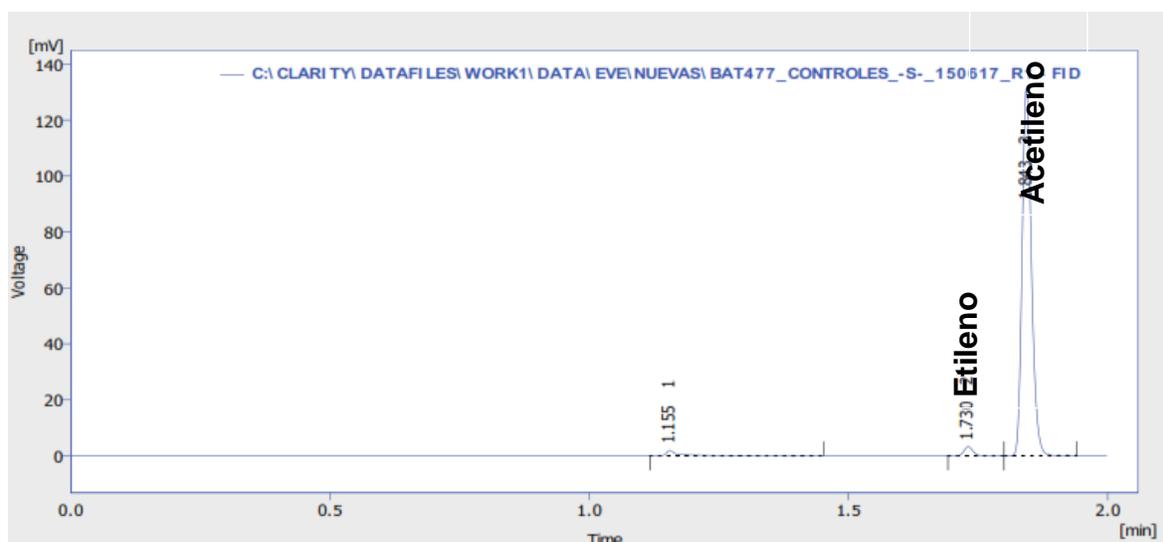
Figura 27. Procedimiento para la fijación de nitrógeno por reducción de acetileno. 1) Se desmoldan las raíces de la maceta y se retira la parte aérea. 2) Se retira la vermiculita y se pesan las raíces frescas con nódulos. 3) Se almacenan en un frasco con rosca. 4) Se sustituye el 10% de aire por acetileno con ayuda de una jeringa. 5) Se incuba durante una hora a temperatura ambiente. 6) Se recolecta el gas con ayuda de un Vacutainer de doble aguja y se guarda en un tubo rojo. 7) Se procede al análisis de muestras en un cromatógrafo de gases.

El CG empleado en el análisis de reducción de acetileno a etileno fue el YL-6500GC System, con una columna de 30 m de largo, diámetro 0.530 mm y grosor 40.0 μm , marca Agilent Technologies, con temperaturas máximas de trabajo de 270/290°C. La temperatura manejada en el horno de la columna fue de 60°C con un tiempo de corrida de 3 min; el capilar de entrada se mantuvo en una temperatura de 110°C, con un flujo de 7

psi y un split ratio de 1/5 (la fracción de muestra que entra). Por su parte, el detector de flama (FID) se manejó en una temperatura de 220°C y con flujos de aire de 300 e hidrógeno de 30. La cantidad de muestra inyectada al cromatógrafo fue de 4 µL.

Para la cuantificación de la actividad de la nitrogenasa en nódulos, fue necesario la obtención de una curva de etileno. Se realizaron diluciones con el stock de etileno de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3} , con sus respectivas 3 réplicas técnicas de 4 µL de volumen gaseoso. Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal con base en el área bajo la curva de cada pico obtenido entre 1.72-1.75 en el tiempo de retención del cromatograma, este valor se encontraba en unidades de mV.s correspondiente a etileno (Figuras 28 y 29, Tabla 11).

Los valores promedios obtenidos del área bajo la curva (Figura 28), también conocida como abundancia, representan el valor de y en la regresión lineal.



Result Table (Uncal - C:\CLARITY\DATAFILES\WORK1\DATA\EVE\NUEVAS\BAT477_CONTROLES_-S-_150617_R1 - FID)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	1.155	4.108	1.948	2.4	1.4	0.02	
2	1.730	3.960	3.264	2.3	2.4	0.02	
3	1.843	165.134	131.539	95.3	96.2	0.02	
	Total	173.203	136.751	100.0	100.0		

Figura 28. Cromatograma de reducción de acetileno a etileno del tratamiento con solo *R. tropici* en nódulos frescos.

Tabla 11. Áreas bajo la curva y el promedio obtenido de los cromatogramas de las diferentes diluciones de etileno.

Curva de Etileno		Abundancia (mV.s)	Y	
Stock		303.891	lectura	Abundancia
1*10 ⁻¹	R1		84.479	Promedio 1 65.6458
	R2		34.85	
	R3		58.32	
	R4		71.45	
	R5		79.13	
1*10 ⁻²	R1		6.442	Promedio 1 6.584666667
	R2		7.019	
	R3		6.293	
1*10 ⁻³	R1		0.798	Promedio 1 0.844333333
	R2		0.842	
	R3		0.893	

Posteriormente, se utilizó la fórmula de los gases ideales (Ec.2), se desejó la n de la ecuación para obtener el número de nanomoles presentes (Ec.3), tomando en cuenta una presión de 1 atm, un volumen de 4×10^{-6} L, la constante R de 0.0821 atm x L/ K x mol y una temperatura de 298 K.

$$Pv = nRT \quad \text{Ec. 2}$$

P = presión; v= volumen; n= número de nanomoles; R= constante de los gases; T= temperatura

$$n = \frac{Pv}{RT} \quad \text{Ec. 3}$$

Sustituyendo todos estos valores en la fórmula, se obtuvo una $n= 1.63494 \times 10^{-7}$ moles. Al convertir este valor a nanomoles, multiplicando por 10^9 (al considerar que por cada mol se tienen 10^9 nanomoles) y por el factor de dilución correspondiente a las tomadas para la curva de etileno, se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 12. Lo anterior representó la x en la regresión lineal.

Tabla 12. Conversión del número de moles a nanomoles para cada dilución.

	X	
n=	1.634 E-07	mol
1*10 ⁻¹	16.34	nmol
1*10 ⁻²	1.634	nmol
1*10 ⁻³	0.1634	nmol

Se gráficaron los valores de x y y , obtenido una regresión lineal de $y = 32.1x - 40.1$ y un valor de $R^2=0.816$.

Tabla 13. Abundancia vs nanomoles obtenidos de etileno en el cromatografo de gases y con base en la fórmula de los gases ideales.

y	x
Abundancia	Nanomoles
0.8	0.1634
6.5	1.634
65	16.34

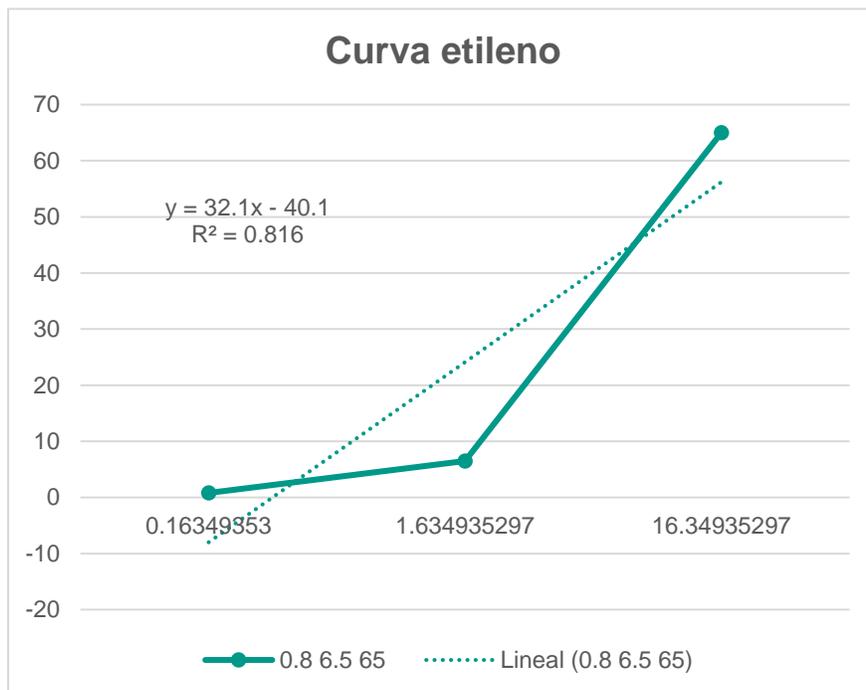


Figura 29. Curva de etileno con los valores de abundancia y número de nanomoles de etileno presentes.

De esta manera se obtuvo una fórmula para obtener el número de nanomoles de etileno obtenidos de acuerdo a la abundancia generada en la incubación con acetileno en cada muestra de los tratamientos inoculados con *R. tropici*. Además, el peso obtenido de los nódulos después de esta prueba se utiliza para comparar entre cada tratamiento la cantidad de nanomoles de etileno fijados por cada gramo de nódulos presentes.

4.11 Histología en nódulos

El análisis de microscopía e histología se realizó en el laboratorio del Dr. Stefan de Folter, en la Unidad de Genómica Avanzada (UGA, Irapuato), con la ayuda de la Dra. Joanna Serwatowska, investigador posdoctoral del laboratorio.

Se utilizaron dos protocolos: 1) Protocolo de tinción de GUS, procedente del laboratorio de la Dra. Cristina Ferrándiz (y comunmente empleado en el laboratorio del Dr. Stefan para inflorescencia de Arabidopsis); y 2) Protocolo de fijación en Paraplast.

En ambos casos se emplearon nódulos maduros a una edad de 28 dpv de cada tratamiento utilizado durante el proyecto.

4.11.1 Protocolo de tinción de GUS

Los nódulos maduros fueron recolectados y depositados en acetona fría al 90% por 20 min a temperatura ambiente. Se desechó la acetona y se realizó un lavado con el buffer sin X-Gluc por 5 min en hielo (modo de preparación Tabla 13); posteriormente se añadió la solución de tinción (buffer con X-gluc) y se colocaron las muestras en vacío por 20 min. Las muestras se dejaron en oscuridad a 37°C por 24 h (Campisi, et al., 1999).

Tabla 13. Soluciones de trabajo para tinciones con GUS.

Reactivos	SIN	CON
Buffer de fosfato pH 7 0.1 M	1 mL	1 mL
EDTA 0.25 M	80 µL	80 µL
Tritón 10%	20 µL	20 µL
X-gluc 40 mM, 20 mg/ml (diluido en DMSO)	-----	100 µL
Ferricianuro de potasio 100 mM	-----	100 µL
Ferrocianuro de potasio 100 mM	-----	100 µL
Agua ultra pura (Mili Q estéril)	900 µL	600 µL
Volumen total	2 mL	2 mL

A continuación, se realizaron las series de deshidratación con etanol a temperatura ambiente, como se muestra a continuación:

- EtOH 20%-----30 min.
- EtOH 35%-----30 min.
- EtOH 50%-----30 min.

- FAE #-----1 hr
- EtOH 70%-----1 día** a 4°C (se puede dejar por largo tiempo)
- EtOH 80%-----30 min.
- EtOH 90%-----30 min.
- EtOH 100%----- 2X 30 min.

La solución de FAE se preparó en un Falcon de 50 mL , tomando 25 mL EtOH 100%, 2.5 mL Ácido acético glacial, 5mL formaldehído al 37% y 17.5 mL H₂O MiliQ estéril. Todas las soluciones a nivel reactivo y siguiendo el orden al agregarlos.

Una vez obtenidas las muestras deshidratadas, se procedió a la preinfiltración de las muestras empleando la solución de preinfiltración, para lo cual se preparó una solución 1:1 (v/v) con la solución de Technovit (Glycol Methacrylate, Technovit H7100 Embedding kit Cat. 14653 Kulzer) y etanol 100%. Posteriormente, las muestras se infiltraron con la solución de infiltración, que consiste en la mezcla de 100 mL de la Solución de Technovit y un sobre en polvo de Hardener I (0.6 g Bag Hardener I, Technovit H7100 Embedding kit Cat. 14653 Kulzer) (Electron Microscopy Science, 2017). En general, esta solución siempre deberá encontrarse preparada y almacenada en el refrigerador a 4°C, ya que su preparación toma una hora de agitación en una placa magnética. Las muestras se colocaron en vacío por 10 min y se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se generaron los bloques de Technovit empleando la solución de polimerización, que consiste en una mezcla de 15 mL de la Solución de infiltración y 1mL Hardener II (Hardener II, Technovit H7100 Embedding kit Cat.14653 Kulzer), y moldes medianos de 1 mL³ de volumen (Disposable base mold, cavity measures:7x7x5mmD, Electron Microscopy Sciences Cat. 62352-07) (Electron Microscopy Science, 2017). Los moldes se colocaron a 37°C por 3 días. Una vez obtenido los bloques sólidos, se procedió a perfilarlos, un método muy rudimentario y poco ortodoxo, el cual consiste en el uso de la fuerza bruta para eliminar las porciones del bloque sobrante que no contienen las muestras con el uso de un formón para madera.

Se realizó el corte de los bloques perfilados a 8 µm en un micrótopo (Leica 2035), hidratando los tejidos con agua destilada entre cada corte. Cada corte se colocó en un portaobjetos con agua destilada en una placa de calentamiento a aproximadamente 42°C (Lab-Line, Sline Warmer). Una vez que se ha secado por completo la muestra se agregan unas gotas de Citoseal 60 (Cytoseal 60, Electron Microscopy Sciences Cat. 18007) y se conservan con un cubreobjeto largo y uno corto.

4.11.2 Protocolo de fijación en Paraplast

Los nódulos maduros se recolectaron y colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Se realizó la fijación del tejido con FAE (Formaldehído 5%, Ácido Acético 10% y EtOH absoluto 50%) por 24 h a temperatura ambiente. Al día siguiente se removió la solución FAE, realizando un lavado con EtOH 70%. Posteriormente, se descartó la solución y se agregó nuevamente EtOH 70%. Las muestras se almacenaron en esta solución por 24 h a 4°C.

A continuación, se realizó el proceso de **deshidratación** del tejido, pasando a 80%, 90% y 100% de EtOH, con cambios de solución cada hora. Una vez que las muestras se colocaron en EtOH 100%, se almacenó el tejido por 12 h a 4°C. Al día siguiente se removió el solvente y se realizó una incubación de 2 h en una solución fresca de EtOH 100%.

La siguiente etapa, conocida como la **pre-inclusión** del tejido, se encuentra dividido en dos partes. En la primera parte, se retiró el EtOH 100% del tejido y se realizaron recambios e incubaciones de 12 h a temperatura ambiente con las soluciones de EtOH-Histoclear 2:1, EtOH-Histoclear 1:1 y EtOH-Histoclear 1:2. Para finalizar la primera parte de la pre-inclusión del tejido, se colocó el tejido en Histoclear al 100% por 12 h.

En la segunda parte, se retiró el Histoclear al 100% y se realizaron recambios e incubaciones de 24 h a temperatura de 60°C en un horno con las soluciones de Histoclear-Paraplast 2:1, Histoclear-Paraplast 1:1 y Histoclear-Paraplast 1:2. Finalmente, el tejido se coloca por 24 h en Paraplast puro. Es importante recalcar que el Paraplast fue previamente colocado en forma de hojuelas en un horno para su fundición y fácil manipulación.

Al día siguiente, se realizó la inclusión en Paraplast, colocando un nódulo por separado en el centro de una mini charola de metal. Se agregó un poco de Paraplast para evitar el movimiento del nódulo y posteriormente se coloca el molde de plástico sobre la mini charola. Se agregó cuidadosamente el Paraplast fundido sobre el nódulo de tal manera que este quedara cubierto completamente. Se dejó secar por 20 min, colocando las mini charolas en agua con hielo para su fácil desmonte.

Se realizaron los cortes de los bloques perfilados a 8 μ m en un micrótomo (Leica 2035). Cada corte se colocó en un portaobjetos con metanol sobre una placa de calentamiento a aproximadamente 42°C (Lab-Line, Sline Warmer). Una vez secadas las muestras por completo, se desparafinaron e hidrataron, colocando por 15min en Xilol al 100%, posteriormente, se colocaron por 5 min en las soluciones de Histoclear-Etanol 2:1, Histoclear-Etanol 1:1 y Histoclear-Etanol 1:2. A continuación, se colocaron por 3 min en soluciones de Etanol desde 100% hasta 50%.

Finalmente, se colocaron directamente 500 μ L de Ácido peryódico (1%) y Reactivo de Schiff (Sigma Aldrich) en los portaobjetos que contenían a las muestras, dejando reaccionar por 15 minutos en la oscuridad. El exceso de colorante se retiró con Etanol al 50% por goteo. Por último, las muestras se sumergieron durante 20 segundos en las soluciones de Etanol al 50%, hasta Xilol al 100%. Se dejaron secar los portaobjetos de manera vertical por 10 segundos y se cubrieron las muestras con Entellan, colocando un cubreobjeto y dejando secar por 24 h.

4.12 Extracción de RNA total

A continuación se describe el protocolo que se realizó con base en la descripción señalada por Life technologies (2012), utilizando el protocolo de la extracción del reactivo Trizol (Life technologies, 15596-026).

Fase de preparación

Se pesaron 100 mg de tejido y se pulverizaron en un mortero con el pistilo en presencia de nitrógeno líquido. Una vez pulverizado se colocó el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente enfriado en nitrógeno líquido. Se adicionó 1 mL de Trizol-Reagent, se mezcló y dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ L de cloroformo, se mezcló por 15 s, hasta generar una mezcla homogénea y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 12,000 x g por 15 min, a 4°C. Se transfirió la fase acuosa o sobrenadante a un nuevo vial y se agregan 600 μ L de una mezcla fenol ácido:cloroformo (1:1). Se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 12,000 x g x 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo vial.

Precipitación del RNA

Se agregaron 500 μ L de isopropanol a cada tubo, se mezclaron de manera invertida e incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 12,000 x g por 10 min a 4°C.

Lavado del RNA

Se removió el sobrenadante de los tubos, se lavó la pastilla con 1 mL de Etanol al 75% (preparado con Agua DEPC). Se mezcló en el vortex hasta desprender la pastilla y se centrifugaron los tubos a 7,500 x g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se invierten los tubos para dejar secar la pastilla por 10 min.

Resuspensión del RNA

Se resuspendieron las pastillas en 50 μ L Buffer TE y se cuantificó el RNA total en el Nanodrop A260/280~2.0, además, se analizó la integridad de RNA en un gel de agarosa

al 1.5% con el buffer de corrida MOPS 1X-DEPC-MiliQ. Las muestras se almacenaron a -80°C.

4.13 Síntesis de cDNA

El protocolo para la síntesis de cDNA se realizó de acuerdo a las indicaciones señaladas por Invitrogen (2010), por medio del uso de la Transcriptasa Reversa SuperScript™ II (Invitrogen, Catálogo 18064-022) .

Se ajustó la concentración de cada muestra de RNA a 2000 ng/μL, colocando 2 μL de cada muestra en un nuevo tubo etiquetado. Posteriormente, se agregó 1 μL de dNTP's 10mM, 1 μL de Oligo dT 10 μM y 8 μL de agua libre de RNase, obteniendo un volumen total de 12 μL. Se colocaron las muestras en un horno a 65°C por 5 min. Pasados los 5 min, se colocaron en hielo por 2 min.

Se realizó un pulso de 10 segundos, para bajar la solución de las paredes hasta el fondo del tubo. Se agregaron 4 μL del Buffer 5x, 2 μL de DTT 0.1M y 1 μL de RNase Out (Invitrogen, Catálogo 10777-019). Se colocaron los tubos en el horno a 42 °C por 2 min. A continuación, se agregó 1 μL de Retrotranscriptasa (SuperScript™ II RT, Invitrogen Catálogo 18064-022) (200 unidades). Se realizó un pulso de 10 segundos. Se colocaron los tubos en un horno a 42°C por 50 min. Finalmente, se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 5 min. Se agregó 1 μL de RNase A (PureLink™ RNase A, Catálogo 12091-021) y se dejó incubando por 1 hora a 37 °C, para eliminar el RNA. Se cuantificaron en el Nanodrop A260/280 y se almacenaron los tubos a -80°C.

4.14 Diseño de oligonucleótidos para q-PCR

Se realizó una búsqueda en la literatura de los genes que estuvieran involucrados en la resistencia a estrés biótico en *Arabidopsis thaliana*. Con base en esta información se seleccionaron los genes *AtPR1*, *AtNPR3*, *Atibs2*, *AtPDF1.2*, *AtWRKY33*, *AtMYC2*, *AtERF6*, *AtPAL2* y *AtLOX1_5* . Además, buscamos la secuencia de la proteína PR10 en *Thalictrum flavum* (TfPR10). Por medio de un BLASTP se buscaron los genes ortólogos en frijol, encontrando los genes *PvPR1*, *PvNRP3*, *Pvibs2*, *PvSymRK*, *PvPDF1.2* (3 pares), *PvMYC2* (2 pares), *PvWRKY33*, *PvPR10*, *PvERF6*, *PvPAL2* y *PvLOX1_5*. Como genes de referencia se emplearon *PvEF-α*, *PvActina11* y *PvTUBA*. Posteriormente, se procedió al diseño de los oligonucleótidos de cada uno de estos genes.

Para el diseño de los oligonucleótidos o primers se utilizó la página de Primer3Plus y Oligo Calc bajo las especificaciones señaladas para el Master Mix Maxima SYBR Green/ROX Qpcr De Thermo Scientific (2013):

- El contenido de GC: 30-60%.
- Longitud de los oligos: 18-30 nucleotidos

- Longitud del amplicón: 70-150 pb.
- Temperatura óptima de amplificación de: 60°C. La Tm de ambos oligonucleótidos no debe sobrepasar una diferencia de 2°C.
- No se deben formar estructuras secundarias (hairpin) ni ser complementarios.

En la Tabla 14 se muestra el nombre del gen encontrado en frijol, la secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño de los amplicones correspondientes a cada uno de los genes empleados durante el proyecto.

Tabla 14. Genes empleados para el análisis de la resistencia sistémica en hojas, raíces y nódulos.

Gen	ID de la proteína en Phytozome (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Nombre de oligos	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon pb
<i>PvPR1</i>	Phvul.006G196900.1	PvPR1_F	CAT GGG TTT GCC TAT GAT CC	113
		PvPR1_R	GAG CGT TGA GGA AGT CTT GG	
<i>PvNPR3</i>	Phvul.006G131400.1	PvNPR3_F	GGT TGT CTC TGA GGT GCT TGG TTT GGG	80
		PvNPR3_R	CAA TAT GAA GCA CCG AGT AGC CCC GAG	
<i>Pvibs2</i>	Phvul.002G115600.2	Pvulbs2_F	ACC GGT CCA AGT TTC AGT CC	109
		Pvulbs2_R	CTA ACG GCG TGT TTG GAA GC	
<i>PvSymRK</i>	Phvul.002G143400	PvuSymRK_F	AAT TCA ATC TCC TTA CTC GTC TTC C	126
		PvuSymRK_R	GTA CTG AAT TGG ATG GAG GAT TAG A	
<i>PvPDF 1.2 (1)</i>	Phvul.002G278600.1	PvPDF1.2(1)_F	ACC AAG CCA CTC TTT CAA GG	83
		PvPDF1.2(1)_R	TCC CAC CAG TAA AAC CTT CG	
<i>PvPDF 1.2 (2)</i>	Phvul.002G278600.2	PvPDF1.2(2)_F	CTT CTG ATA TGG GCG TGA TG	129
		PvPDF1.2(2)_R	TCC CAC CAG TAA AAC CTT CG	
<i>PvPDF 1.2 (3)</i>	Phvul.002G278600.3	PvPDF1.2(3)_F	GGT TTG CAT TGG TTC TCC TC	98
		PvPDF1.2(3)_R	ACC CTT GAA AGA GTG GCT TG	
<i>PvMYC 2 (1)</i>	Phvul.003G285700.1	PvMYC2(1)_F	AAT GGA ATG ACG GAG TAC CG	110
		PvMYC2(1)_R	AGC CAA AGG GAG GAG AAA TC	

<i>PvMYC2</i> (2)	Phvul.003G285700.1	PvMYC2(2)_F	CGG AGG TGA TTT TCC AGA AC	144
		PvMYC2(2)_R	CAA TCG AGG AAG AAG GGT TG	
<i>PvWRKY33</i>	Phvul.008G251300.1	PvWRKY33_F	CAT ACC CAA ATT GCC CTA CG	105
		PvWRKY33_R	TAG ATT GAG GCT TGG GAT GG	
<i>PvPR10</i>	Phvul.002G209500.1	PvPR10_F	TTC GAG GAC CAA ACC ACT TC	123
		PvPR10_R	GCC CTC AAC GAT TTC AAC AC	
<i>PvERF6</i>	Phvul.002G055800.1	PvERF6_F	TAA CTC ATC CGC AAC ACT CG	90
		PvERF6_R	ATT TGG AAG AGG GGG AAC TG	
<i>PvPAL2</i>	Phvul.007G150500.1	PvPAL2_F	AAA TCT GCT TCC CCA CTC AC	70
		PvPAL2_R	CTT TTC CAT TGG GCG TTG	
<i>PvLOX 1_5</i>	Phvul.006G091400.1	PvLOX1_F	TGA ATG CCC TCG AAG AGA AC	133
		PvLOX1_R	CCC ATA AAC TCG TGA AGA CG	
<i>PvEF-A</i>	Phvul.004G075100.1	PvEF-A_F	GGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG	146
		PvEF-A_R	GCA CCC AGG CAT ACT TGA ATG ACC	
<i>PvAct11</i>	Phvul.008G011000.1	PvuAct11_F	TGC ATA CGT TGG TGA TGA GG	190
		PvuAct11_R	AGC CTT GGG GTT AAG AGG AG	
<i>PvTubulina</i>	Phvul.002G007900.1	PvTUB_R	CAA CCA TGA GTC GAG TGA CC	110
		PvTUB_F	TGG GAA TGG AAT CAA GTT CA	

4.15 Análisis de expresión por PCR

Se analizó la expresión de los genes candidatos por PCR punto final, antes de ser analizados por q-PCR, realizando la siguiente reacción en hojas, raíces y nódulos (Tabla 15). Se colocaron las reacciones en un termociclador con 30 ciclos a una temperatura de amplificación de 60°C, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para q-PCR. Posteriormente se analizaron las amplificaciones en un gel de agarosa al 2% con el buffer de corrida TAE 1X-DEPC-MiliQ.

Tabla 15. Reacción para PCR.

Reactivos	1x
10x Buffer	2
MgCl₂ 50 mM	0.6
dNTP's 10 mM	0.4
Mix de oligos 2 μM	1
Taq Polimerasa DNA 5 U/μL	0.2
cDNA (50ng/μL)	0.8
H₂O libre de DNases	15
Total	20 μL

4.16 Análisis de expresión por q-PCR

Se analizó la expresión de genes relacionados con la defensa en hojas, raíces y nódulos, considerando los siguientes genes *PvPR1*, *PvWRKY33* y *PvMYC2*; y como genes de referencia se utilizaron *PvAct11* y *PvTubulina*. Para este análisis se utilizó el Master Mix de SYBR Green de Thermo Scientific, por lo que siguió el protocolo planteado por Thermo Scientific (2013).

Se realizaron diluciones iniciales a una concentración de 50 ng/μL de las muestras, y se agregaron 2 μL de la dilución inicial de cada muestra en tubos nuevos, colocados sobre hielo. Posteriormente, se agregaron 21 μL del agua libre de DNases y 30 μL de Master Mix SYBR Green (Thermo Scientific, Cat. K0222), generando una mezcla que contemplaba 3 réplicas técnicas por muestra.

Para el análisis en placa (MicroAmp™ Fast optical 48-Well reaction plate, Applied Biosystems, Cat. 4375816) de cada uno de estos genes, se agregó a cada pozo 2 μL del Mix de oligos (conteniendo el Forward y Reverse, 10 μM), por triplicado técnico. El volumen total por reacción fue de 20 μL. Se colocó la filmína (MicroAmp™ 48-Well Optical Adhesive Film, Cat. 4375323) y se centrifugó la placa a 1500 r.p.m por 20 segundos, utilizando el rotor de 221.16 para placa, en una centrifuga HERMLE Labnet 2326. Finalmente, se llevó la placa al termociclador de tiempo real StepOne (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cat. 4376357) con un tiempo de corrida de 2 horas. La temperatura de amplificación empleada fue de 58°C con 30 ciclos.

4.17 Cuantificación de la expresión génica por qPCR

Una vez que los 30 ciclos de amplificación se han completado en el equipo, se analizan los datos obtenidos en el equipo por medio del programa StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Para lo cual, se empleó la siguiente fórmula que nos permite determinar el valor de $\Delta\Delta Ct$, por medio del valor promedio de las 3 réplicas técnicas empleadas.

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

$$\Delta Ct2 = (Ct \text{ blanco} - Ct \text{ control}) \text{ condición inicial}$$

$$\Delta Ct2 = (Ct \text{ blanco} - Ct \text{ control}) \text{ tiempo } X$$

V. RESULTADOS

5.1 OE1. Analizar los cambios fenotípicos en hojas, raíces y nódulos al aplicar BABA, *R. tropici*-GUS y *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

5.1.1 Efecto en la germinación con BABA en las raíces

Con el objetivo de conocer los efectos que pudiera generar BABA, al interactuar directamente durante el desarrollo de las raíces, se analizó el efecto del activador sintético (BABA) durante la germinación en 25 plántulas de 3 dpq, comparando los resultados obtenidos con plántulas germinadas con agua destilada. El modelo analizado en este experimento es nombrado como BABA 0 dpq.



Figura 30. Plántulas germinadas con agua destilada estéril y BABA 100 μ M.

Sin embargo, una vez realizadas las mediciones de la longitud de la radícula, del hipocótilo y número de raíces secundarias, no se encontraron diferencias significativas utilizando la prueba de T-student. Obteniendo un valor de $P=0.6238$ en el caso del tamaño de la raíz principal (Figura 31), $P=0.0953$ para el tamaño del hipocótilo (Figura 32) y $P=0.2333$ para el número de raíces secundarias a los 3dpq (Figura 33).

Tamaño de la raíz principal en plántulas (3dpg)

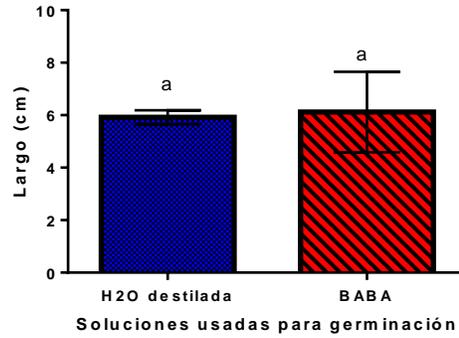


Figura 31. Tamaño de la raíz principal en plántulas de 3dpg germinadas con agua destilada estéril y BABA 100 μ M. Las barras representan la media \pm el error estándar (SEM). Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (T-student, n=25).

Tamaño del hipocótilo en plántulas (3dpg)

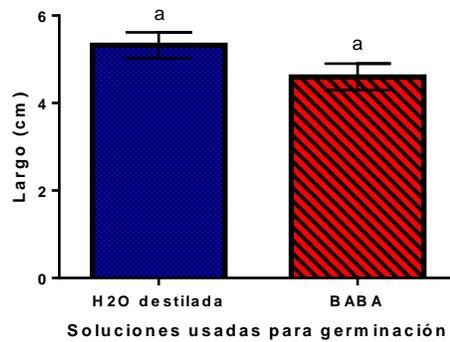


Figura 32. Tamaño del hipocótilo en plántulas de 3dpg germinadas con agua destilada estéril y BABA 100 μ M. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (T-student, n=25).

Número de raíces secundarias en plántulas (3dpg)

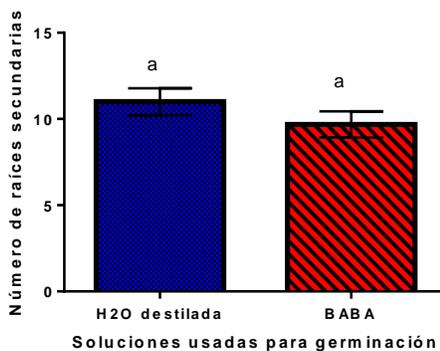


Figura 33. Número de raíces secundarias en plántulas de 3dpg germinadas con agua destilada estéril y BABA 100 μ M. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (T-student, n=25).

5.1.2 Medición de altura

Se realizó la medición de las alturas de 10 plantas de cada uno de los tratamientos a los 28 dpg (Figura 34). Posteriormente, se realizaron dos análisis estadísticos: ANOVA y Tukey, para identificar las diferencias significativas que pudieran encontrarse entre los tratamientos.

Los controles utilizados se emplearon en todos los modelos, para ser comparables las mediciones obtenidas entre cada uno de ellos.

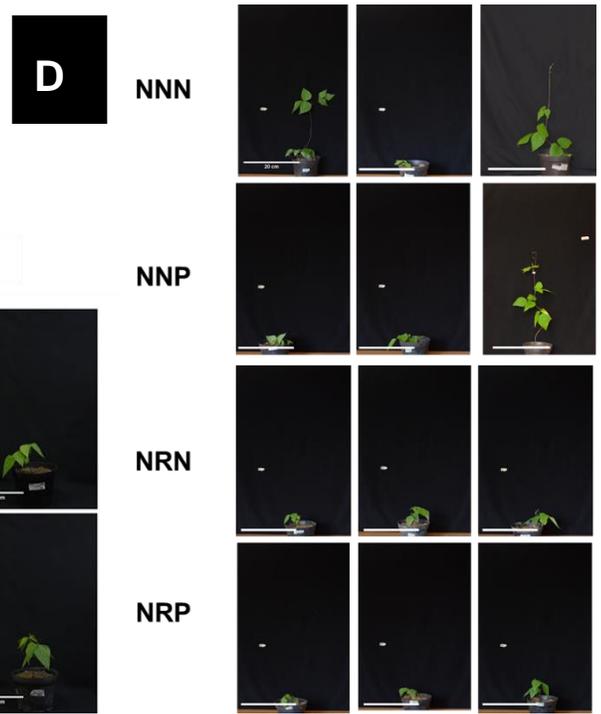
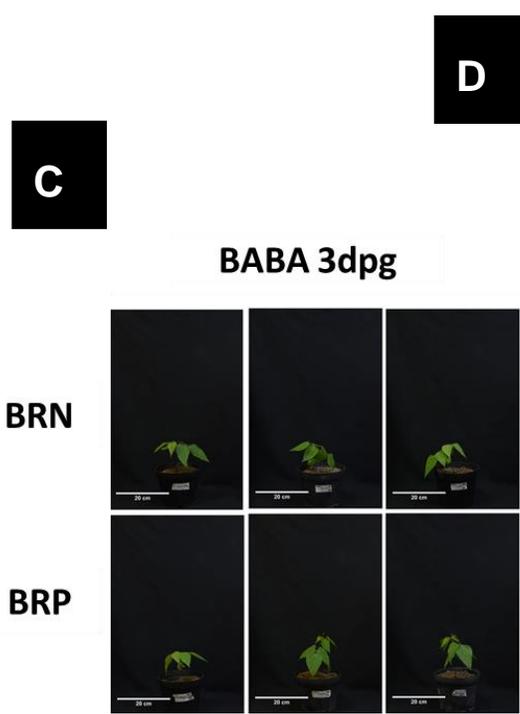
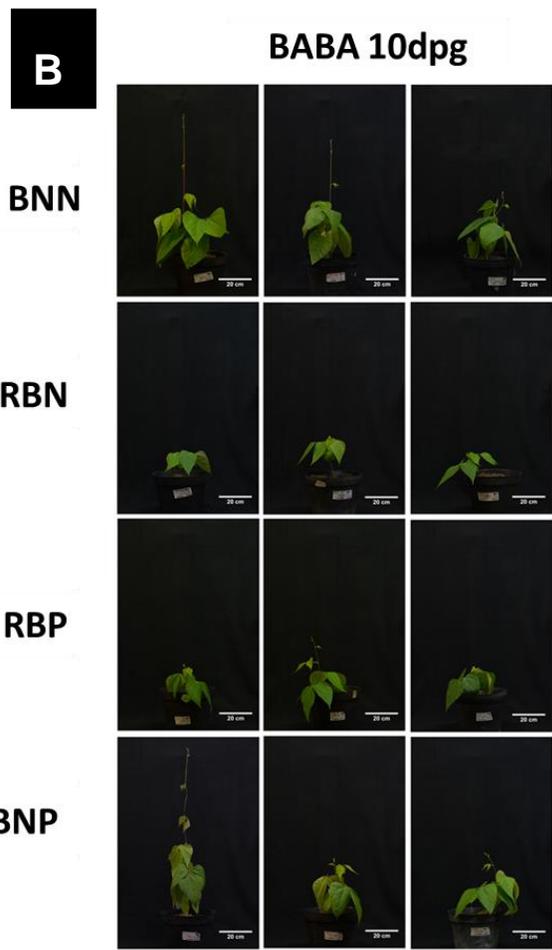
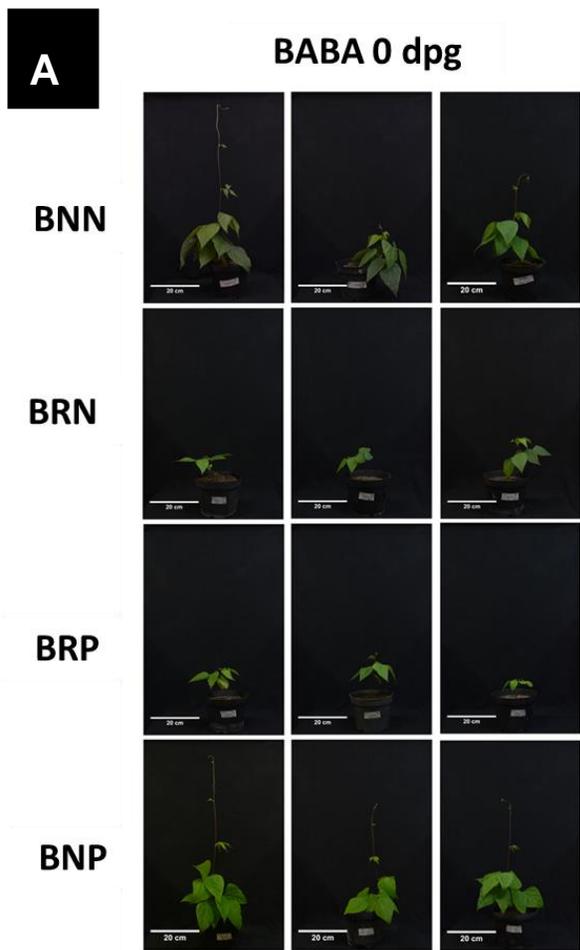


Figura 34. Paneles de fotos representativas de 3 plantas por cada tratamientos en los diferentes modelos empleado. A) BABA 0 dpj. B) BABA 10 dpj. C) BABA 3 dpj, D) Controles. Barra de escala= 20cm, n=10.

BABA 0 dpj

En la Figura 35, se muestran las alturas obtenidas a los 28 dpj en plantas tratadas durante la germinación con BABA a una concentración de 100 μ M, y sus respectivos controles sin BABA.

Tanto en la Figura 34, como en la Figura 35, podemos observar que la inoculación de *R. tropici*-GUS, o la combinación de *R. tropici*-GUS con BABA y/o *P. syringae*, provoca una disminución en el tamaño de la planta, a los 28 dpj, en comparación al tratamiento control que no ha sido inoculado con *R. tropici*-GUS, NNN, pero que ha sido suplementado con nitrógeno durante las fertilizaciones con la solución B&D (más 8 mM de KNO_3 , como fuente de nitrógeno). Dicho efecto se observa en los tratamientos BRN, BRP y NRN (Figura 35).

Sin embargo, el tratamiento NRP, no muestra diferencias significativas entre los controles NNN, NNP y NRN, por lo que la tendencia se encuentra en un punto medio del análisis, mostrando una compensación de este efecto debido a la aplicación de *P. syringae* (Figura 35).

Por su parte, los tratamientos BNN y BNP no mostraron diferencias significativas con respecto a NNN y NNP (Figura 35).

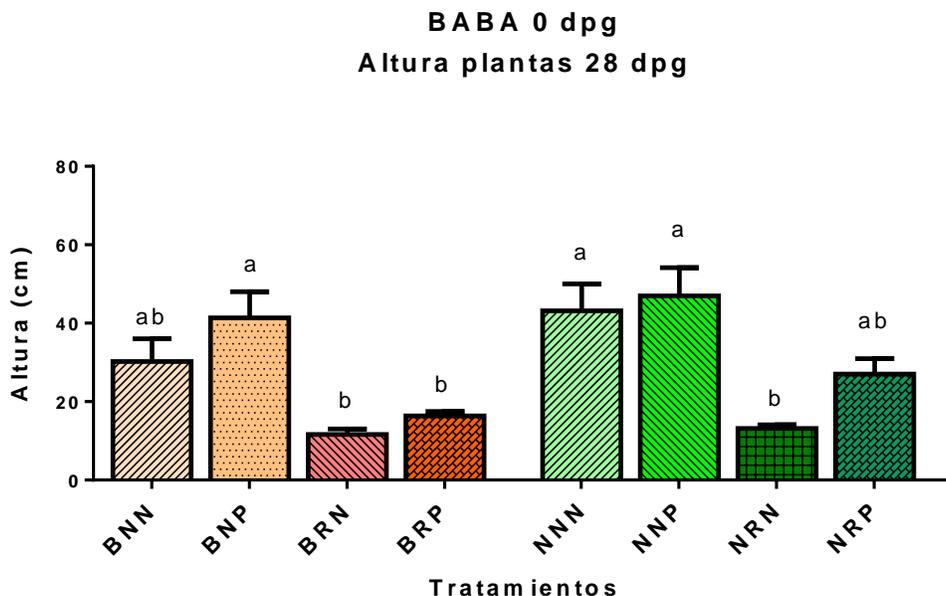


Figura 35. Altura de las plantas en el modelo de BABA 0 dpg, así como los controles sin la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N=nulo . Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=10).

BABA 10 dpg

En la Figura 36 se muestran los resultados del modelo BABA 10 dpg. Como se puede apreciar, las plantas del tratamiento BNP, mostraron un aumento significativo en la altura a los 28 dpg, con respecto a los demás tratamientos. Al mismo tiempo, el tratamiento BNN no mostró diferencias significativas con respecto a NNN y NNP (Figura 36).

De igual manera a lo ya señalado, las plantas tratadas con *R. tropici-GUS* (fertilizadas con la solución B&D, sin nitrógeno), mostraron una disminución de la altura, en comparación con los tratamientos suplementados con nitrógeno en la fertilización, como es el caso de los tratamientos RBN y RBP (Figura 36).

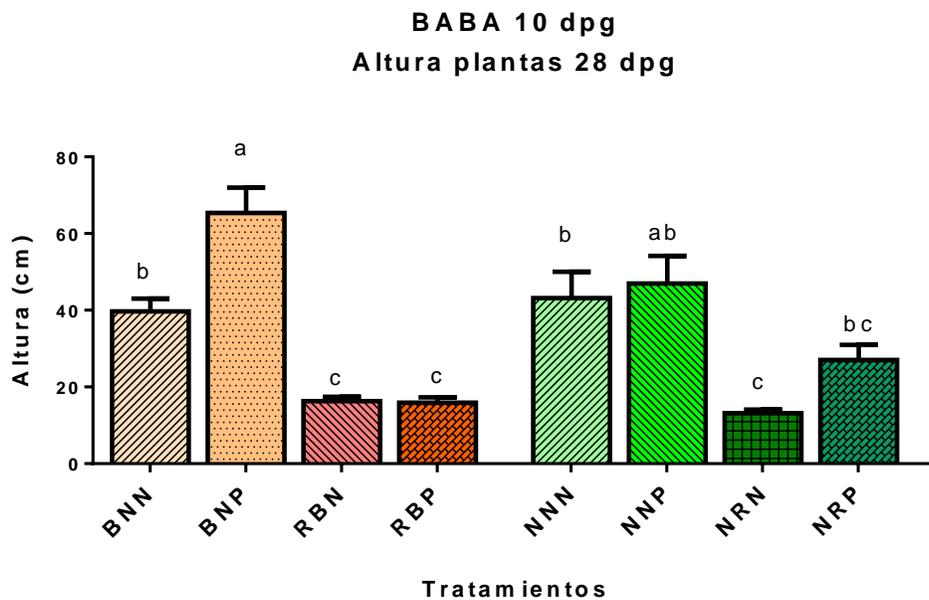


Figura 36. Altura de las plantas en el modelo de BABA 10 dpg, así como los controles sin la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=10).

BABA 3 dpg

De igual manera que en los modelos BABA 0 dpg y BABA 10 dpg, la inoculación de *R. tropici-GUS* generó una disminución significativa a comparación de los demás

tratamientos que no fueron inoculados con esta bacteria (pero suplementados con nitrógeno durante la fertilización), como podemos observar en los tratamientos {BR}N y {BR}P (Figura 37).

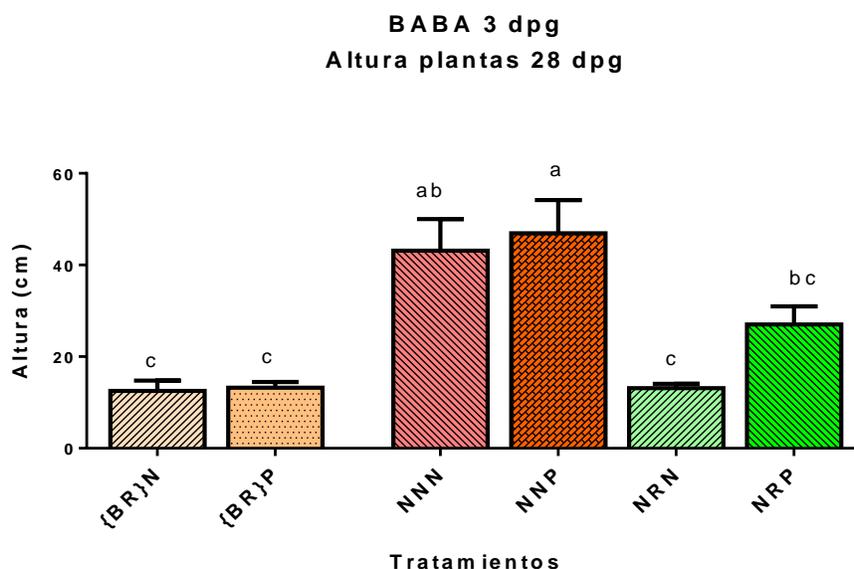


Figura 37. Altura de las plantas en el modelo de BABA 3 dpv, así como los controles sin la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=10).

5.1.3 Largo de la raíz principal

Se realizó la medición del largo de la raíz principal en 6 plantas de cada uno de los tratamientos a los 28 dpv. Posteriormente, con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico ANOVA de una vía y Tukey. Con base en los análisis se asignó con una letra a cada barra, mostrando de esta manera las diferencias estadísticas.

BABA 0 dpv

No se encontraron diferencias significativas con respecto a la longitud de la raíz principal, a los 28 dpv, entre las plantas tratadas durante la germinación con BABA 100 μ M (BNN, BRN, BRP y BNP) y las germinadas con agua destilada (NNN, NRN, NRP, NNP) a una edad de 28 dpv. Sin importar que las plantas hayan sido regadas con una solución B&D, con o sin nitrógeno (Figura 38).

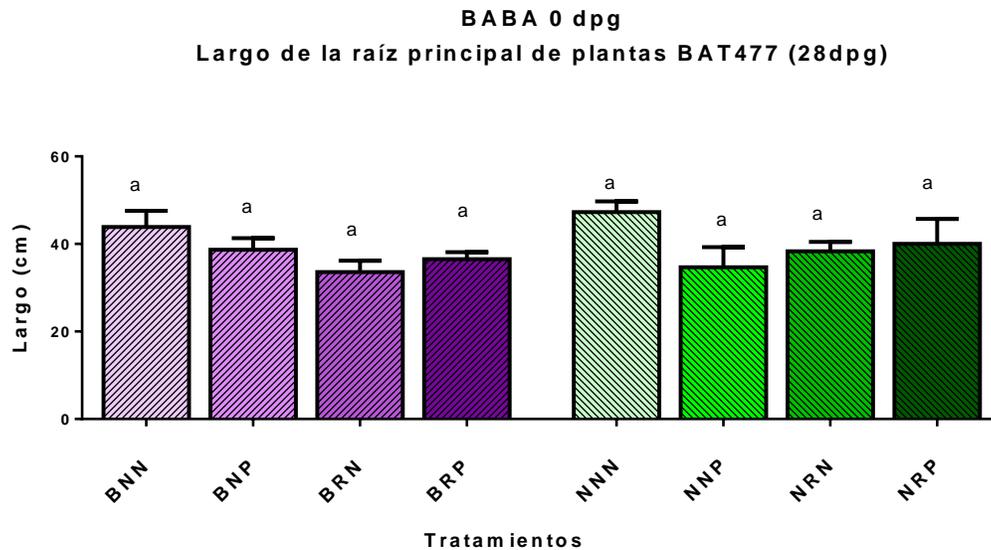


Figura 38. Largo de la raíz principal de las plantas en el modelo de BABA 0 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=6).

BABA 10 dpj

Las plantas del tratamiento BNP mostraron un menor tamaño en el largo de la raíz principal a los 28 dpj, a comparación de los demás tratamientos. Sin embargo, los demás tratamientos BNN, BRP y BRN no presentaron diferencias significativas a comparación de los controles NNN, NRN, NRP y NNP (Figura 39).

Cabe señalar que, a pesar de que las raíces del tratamiento BNP presentaron una menor longitud de la raíz, dichas plantas mostraron un aumento significativo en la altura total de la planta a los 28 dpj (Figura 35).

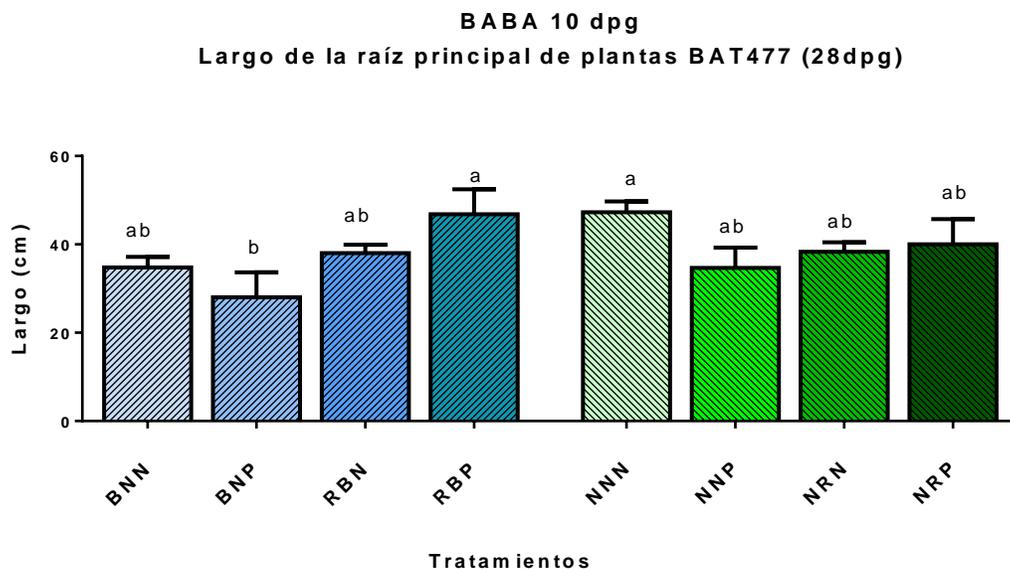


Figura 39. Largo de la raíz principal de las plantas en el modelo de BABA 10 dpv, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P=0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=6$).

BABA 3 dpv

Como se puede apreciar en la Figura 40, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos con respecto al largo de la raíz principal a los 28 dpv, tanto con {BR}N y {BR}P y en comparación a los controles (NNN, NRN, NRP y NNP) (Figura 40).

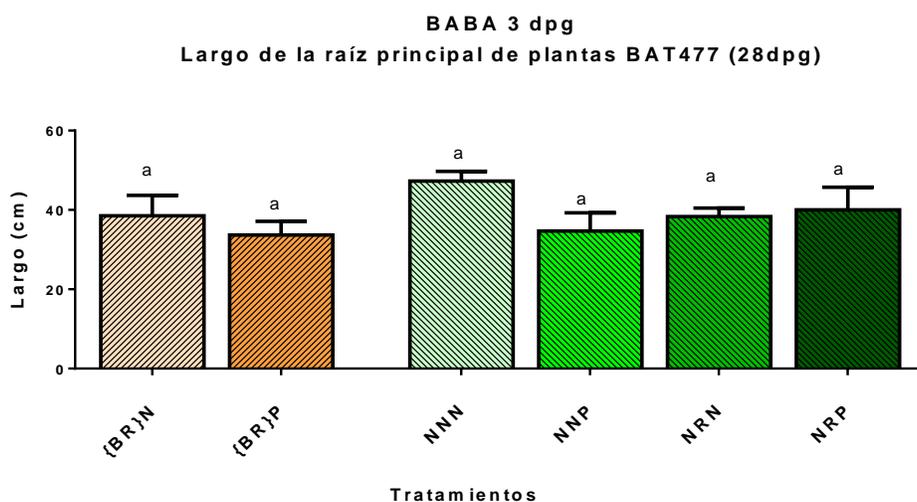


Figura 40. Largo de la raíz principal de las plantas en el modelo de BABA 3 dpv, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo.

P. syringae, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P=0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=6$).

5.1.4 Peso fresco de la parte aérea

Se determinó el peso fresco de la parte aérea de las plantas, tomando en consideración tanto el tallo como las hojas presentes, para obtener el peso fresco de 6 plantas de cada uno de los tratamientos a los 28 dpq. A continuación, los datos obtenidos se analizaron por ANOVA de una vía y Tukey.

BABA 0 dpq

Como se muestra en la Figura 35, el peso fresco de la parte aérea a los 28 dpq, se ve influenciado por la altura de las plantas, teniendo un comportamiento acorde con el mismo (Figura 35). Por lo que los tratamientos que presentaron una menor altura, también presentaron un menor peso fresco y del mismo modo aquellos que tenían una mayor altura.

De esta forma, los tratamientos inoculados con *R. tropici*-GUS presentaron diferencias significativas en cuanto al peso fresco de la parte aérea, tales como: BRN, BRP y NRN, en comparación de los controles.

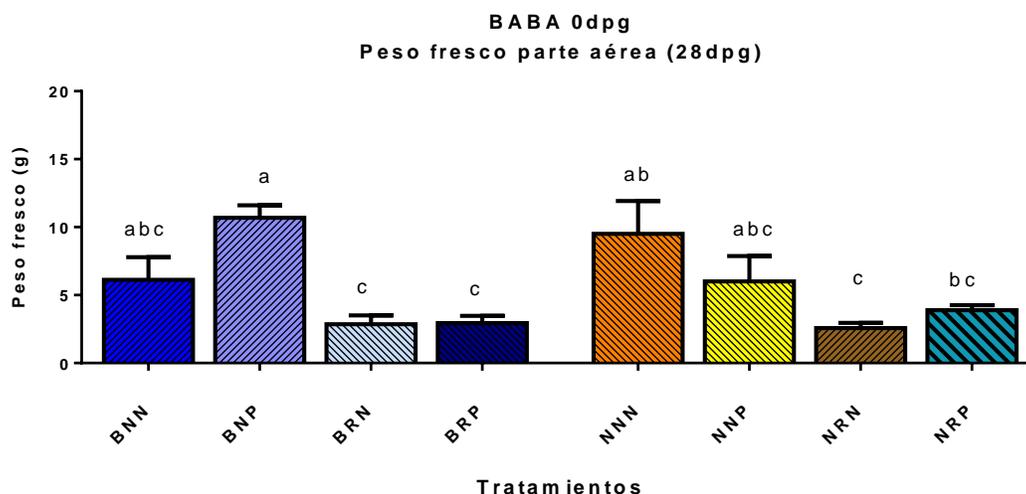


Figura 41. Peso fresco de la parte aérea de las plantas en el modelo de BABA 0 dpq, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, $P=$ *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P=0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=6$).

BABA 10 dpq

De igual manera que BABA 0 dpq, el peso fresco de la parte aérea se observó relacionado con la altura a los 28dpq en cada tratamiento. Por lo que, los tratamientos inoculados con *R. tropici-GUS*, como son: RBN, RBP, NRN y NRP, mostraron diferencias significativas a comparación de los controles.

El tratamiento BNP que había presentado una altura mayor que los controles, de igual manera, presentó una tendencia mayor en cuanto al peso fresco en la parte aérea.

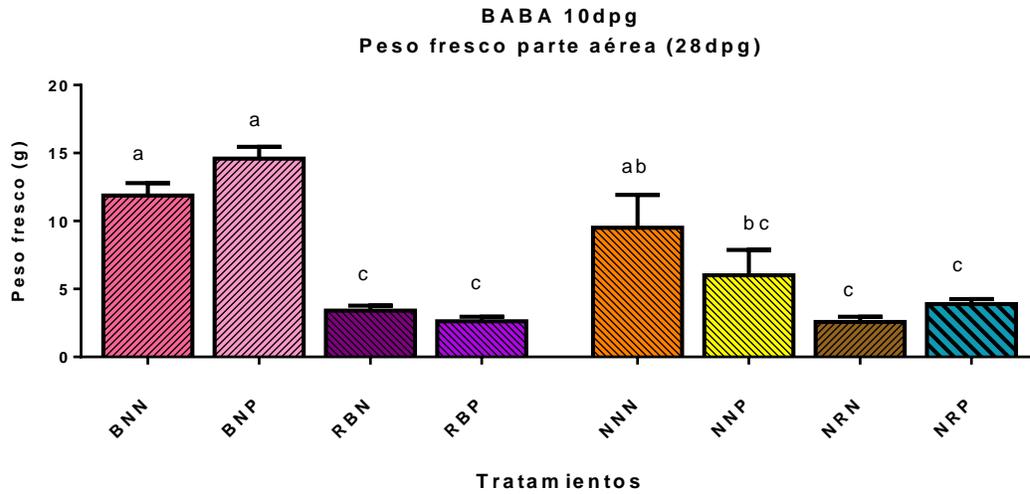


Figura 42. Peso fresco de la parte aérea de las plantas en el modelo de BABA 10 dpq, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=6$).

BABA 3 dpq

Las combinaciones {BR}N y {BR}P presentaron el mismo comportamiento que los tratamientos inoculados con *R. tropici-GUS* en los modelos de BABA 0 dpq y BABA 10 dpq. Por lo que, al inocular con esta bacteria las plantas presentaron una menor altura y un menor peso fresco en la parte aérea, presentando diferencias significativas marcadas en comparación con los controles.

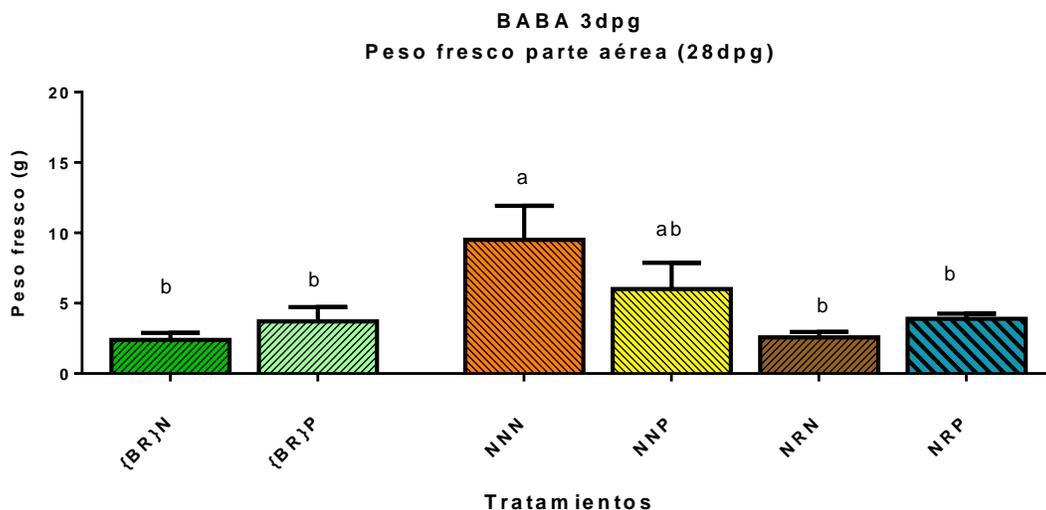


Figura 43. Peso fresco de la parte aérea de las plantas en el modelo de BABA 3 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=6).

5.1.5 Peso fresco de las raíces

Se pesaron las raíces de las plantas, los nódulos presentes en las plantas inoculadas *R. tropici-GUS*, obteniendo el peso fresco de 7 plantas de cada uno de los tratamientos a los 28 dpg. A continuación, los datos obtenidos se analizaron por ANOVA de una vía y Tukey.

BABA 0 dpg

El comportamiento de los tratamientos inoculados con *R. tropici-GUS* se mostraron relacionados tanto el peso fresco en la parte aérea como en las raíces, por lo que plantas con diferencias significativas en la altura, también presentaron diferencias significativas en el peso fresco de la parte aérea y de las raíces. Como son los tratamientos: BRN, BRP, NRN y NRP.

Los tratamientos que no fueron inoculados con *R. tropici-GUS* no presentaron diferencias significativas en el peso fresco de las raíces a comparación de los controles.

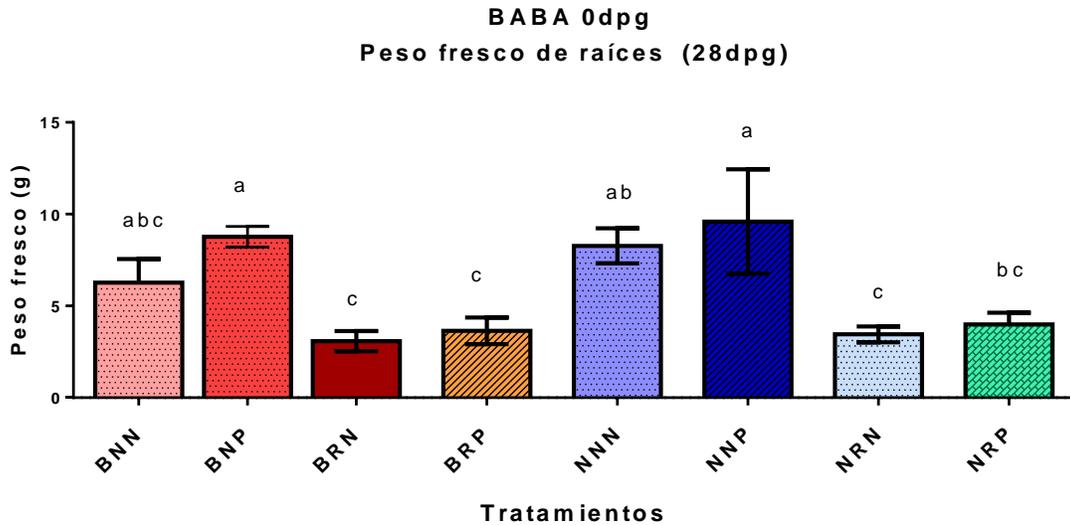


Figura 44. Peso fresco de las raíces de las plantas en el modelo de BABA 0 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 10 dpg

El tratamiento BNP presentó diferencias significativas con los controles, mostrando un mayor peso fresco en las raíces a los 28 dpg. El tratamiento BNN no presentó diferencias significativas con NNN y NNP. Por su parte los tratamientos inoculados con *R. tropici-GUS* (RBN, RBP, NRN y NRP) presentaron diferencias significativas con respecto a los controles, obteniendo una disminución en el peso fresco de las raíces.

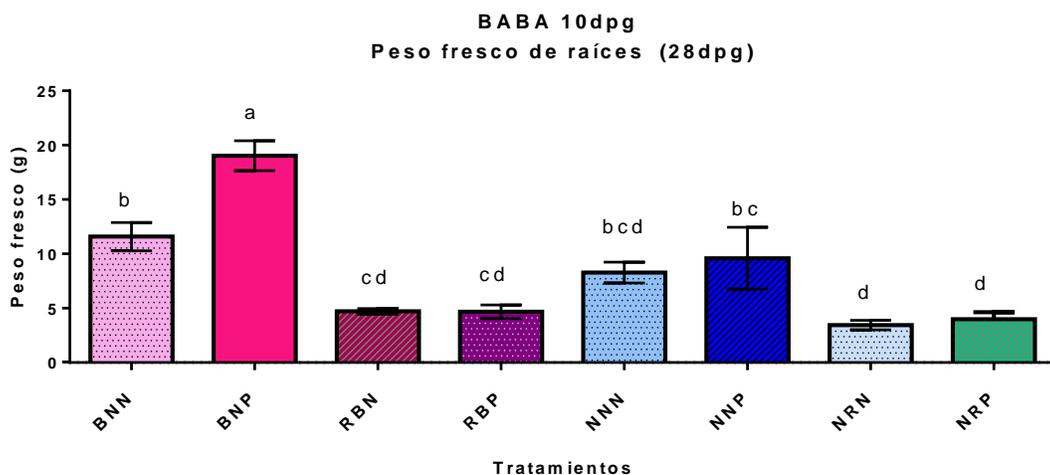


Figura 45. Peso fresco de las raíces de las plantas en el modelo de BABA 10 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

P. syringae, N= nada. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 3 dpq

Como se ha venido observando, los tratamientos inoculados con *R. tropici*-GUS presentan una disminución en el peso fresco de las raíces a los 28 dpq. Pudiéndose observar de una manera clara en los tratamientos {BR}P, NRN y NRP. Por su parte, el tratamiento {BR}N no mostró diferencias significativas entre los demás tratamientos, sin embargo, la tendencia de los datos se observó menor que NNN y NNP. Mostrando un comportamiento, más relacionado con {BR}P, NRN y NRP.

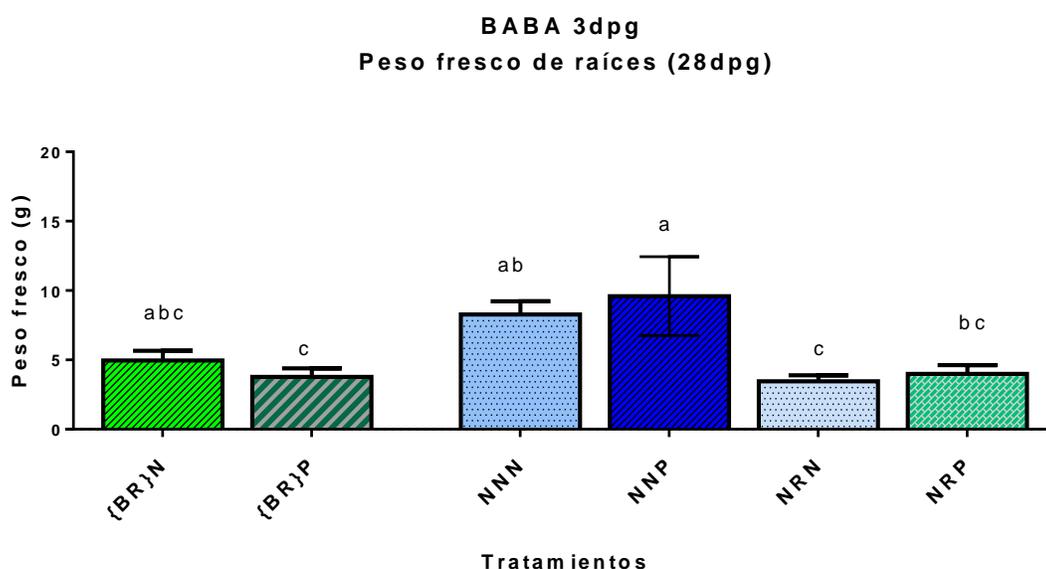


Figura 46. Peso fresco de las raíces de las plantas en el modelo de BABA 3 dpq, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

5.1.6 UFC de *P. syringae* de hojas infectadas

Se contaron las colonias presentes en las cajas Petri con medio KB inoculadas con las hojas molidas, infectadas anteriormente con *P. syringae* a los 17 dpq. Se emplearon las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para inocular las cajas y de ahí realizar conteos. En total se analizaron 12 datos por tratamiento de los conteos obtenidos. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y Tukey.

BABA 0 dpj

Los tratamientos NRP y BNP tuvieron una tendencia menor en la presencia de la bacteria *P. syringae* en las hojas. Al observar los datos, con base en el número de bacteria presentes en las hojas, podemos observar que no hay diferencias significativas con el control NNP (Figura 47).

Sin embargo, al aplicar el logaritmo con base 10 en los datos, las diferencias se vuelven más significativa entre los tratamientos (Figura 48). Mostrando que existe una resistencia local por parte de la inoculación de *R. tropici* y la aplicación de BABA, en las hojas que han sido infectadas por *P. syringae*, pero solo cuando son aplicados por separado, ya que la combinación de ambos activadores de defensa provoca la disminución en la resistencia y por ende la propagación de la bacteria.

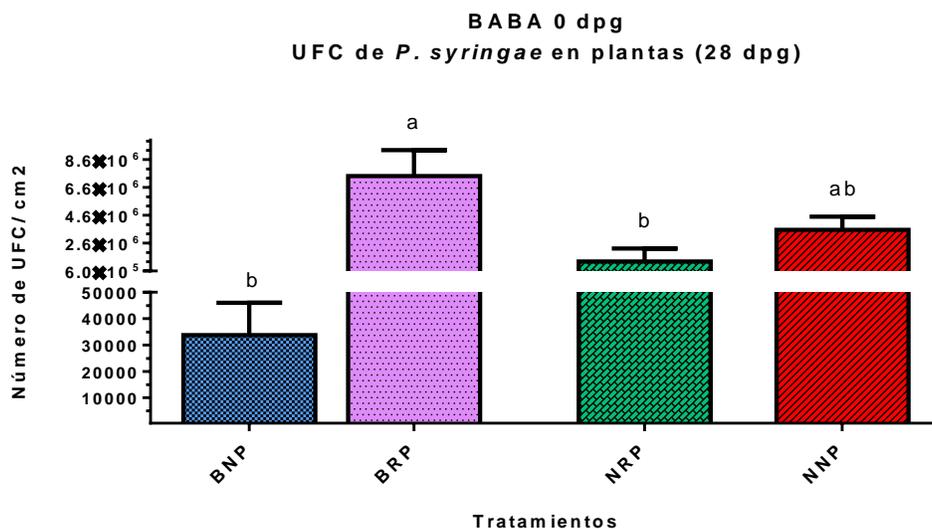


Figura 47. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 0 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=12$).

BABA 0 dpg
UFC de *P. syringae* en plantas (28 dpg)

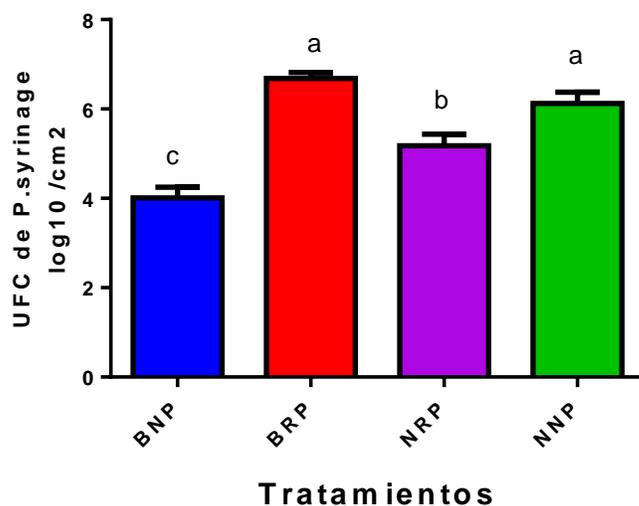


Figura 48. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 0 dpg con base log₁₀, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=12).

BABA 10 dpg

Los tratamientos BNP, RBP y NRP mostraron una tendencia menor en la presencia de la bacteria *P. syringae* en las hojas infectadas. Al analizar los datos del número de UFC presentes en las hojas, podemos observar que existen diferencias significativas entre BNP y RBP con respecto al control NNP. Sin embargo, el tratamiento NRP no muestra diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 49). Con base en la gráfica podemos observar que el tratamiento RBP muestra un sinergismo entre la aplicación de *R. tropici*-GUS y BABA, aún mejor que la aplicación de BABA o *R. tropici* por sí sólo.

Por su parte, al aplicar el logaritmo con base 10 en los datos, los resultados difieren ya que muestra que el tratamiento BNP y NNP no tienen diferencias significativas, pero los tratamientos RBP y NRP cuentan con diferencias significativas con respecto a NNP (Figura 50).

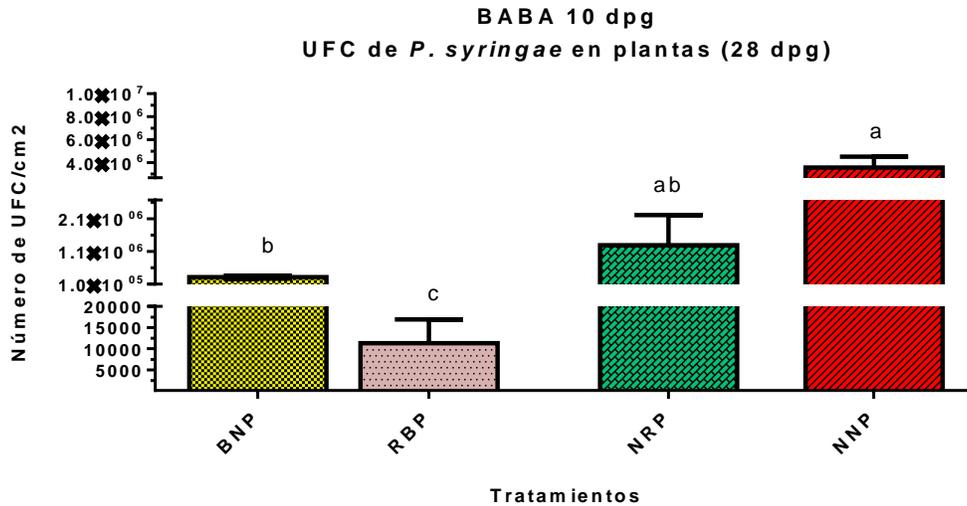


Figura 49. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 10 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=12$).

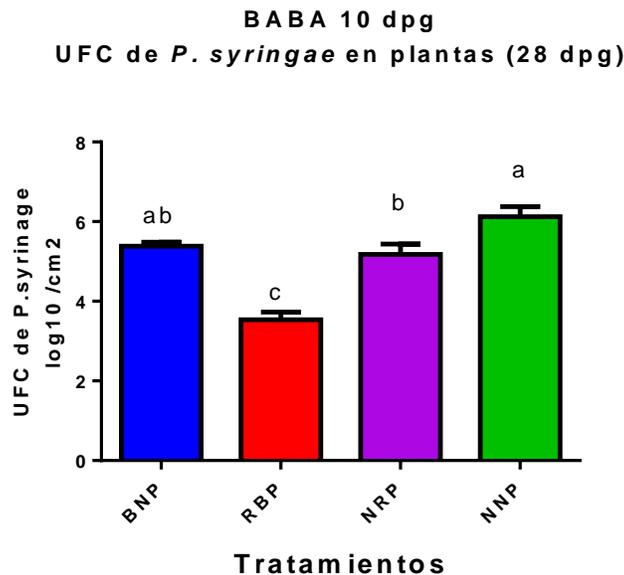


Figura 50. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 10 dpj con base log₁₀, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nada. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=12$).

BABA 3 dpq

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos {BR}P, NRP y NNP (Figura 51). Por lo que, la aplicación simultánea de BABA con *R. tropici* provoca una disminución en la defensa, mostrando la propagación y proliferación de la bacteria en las hojas infectadas.

Al aplicar el logaritmo con base 10 a los resultados, podemos observar que el tratamiento NRP mostró una disminución en la defensa con diferencias significativas con respecto al control NNP (Figura 52).

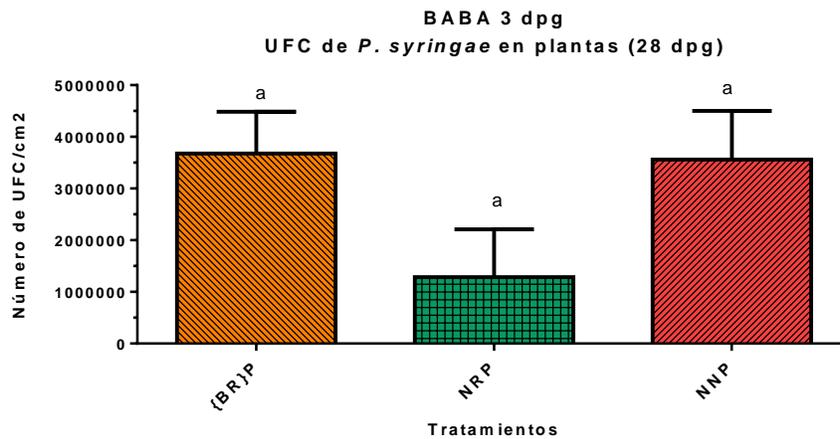


Figura 51. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpq, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. . Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=12$).

BABA 3 dpg
UFC de *P. syringae* en plantas (28 dpg)

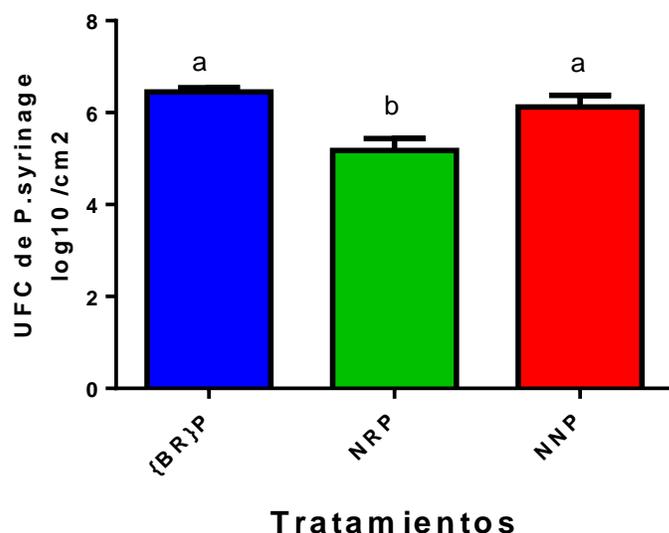


Figura 52. Número de UFC presentes en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpg con base log₁₀, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=12).

5.1.7 Porcentaje de daño por *P. syringae*

Para el porcentaje de daño se tomaron en cuenta el halo clorótico y la necrosis presentes en las hojas infectadas por *P. syringae* a los 28 dpg. Se analizaron 7 plantas por tratamiento. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y Tukey (Figura 53).

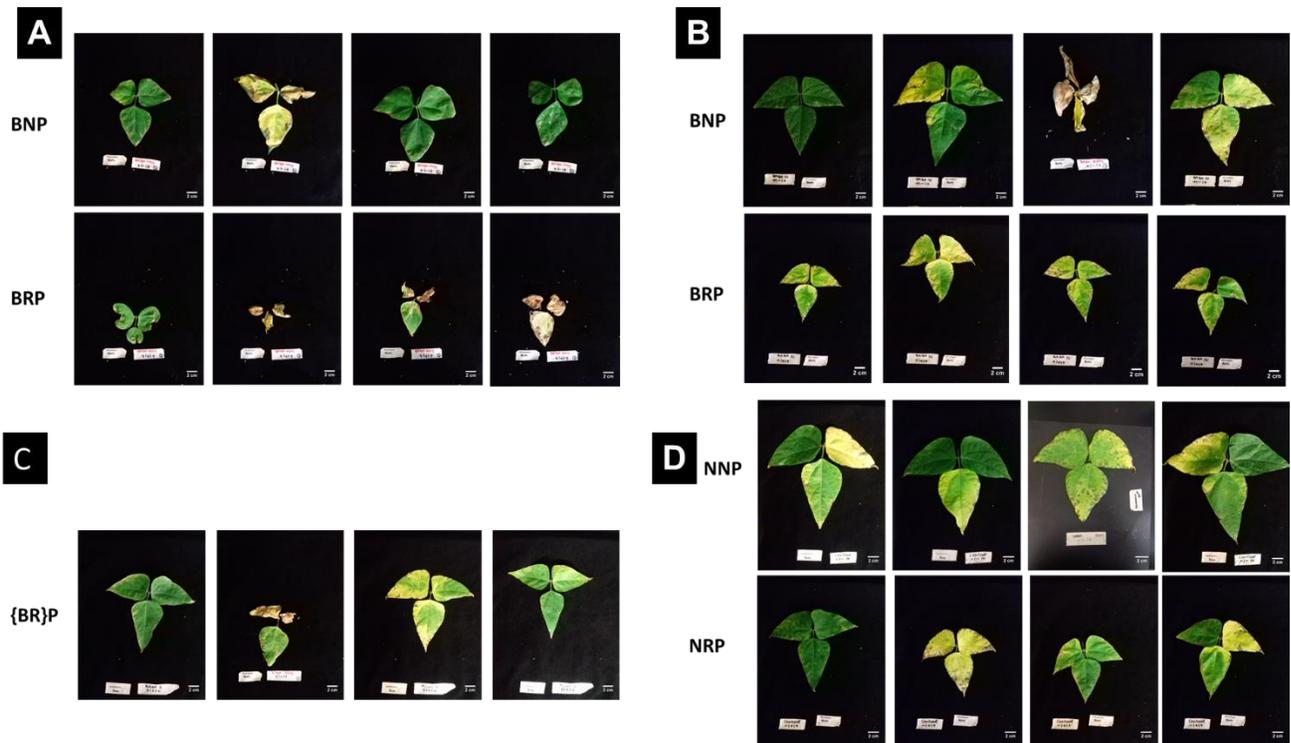


Figura 53. Paneles de fotos representativas de 3 plantas por cada tratamientos en los diferentes modelos empleado con respecto al daño foliar ocasionado por *P. syringae* pv *phaseolicola* a 28 dpv. A) BABA 0 dpv. B) BABA 10 dpv. C) BABA 3 dpv, D) Controles.

BABA 0 dpv

Respecto al porcentaje de daño no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos BNP, BRP, NRP y NNP. A pesar de observar una disminución en la población bacteriana de *P. syringae* en el tratamiento de BNP, las hojas infectadas presentaron hojas cloróticas y con necrosis (Figura 54).

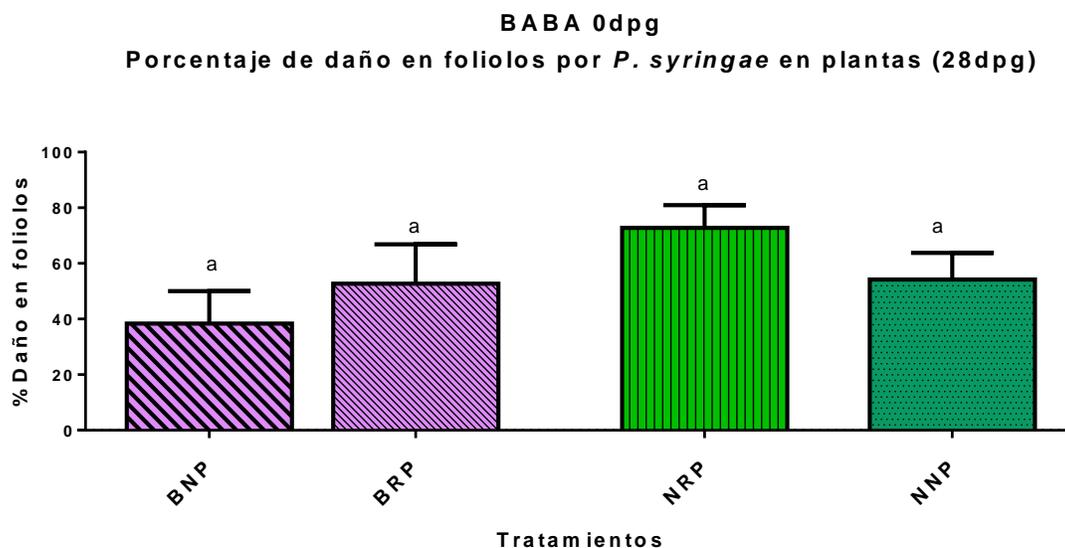


Figura 54. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 0 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

BABA 10 dpg

Los tratamientos BNP y BRP mostraron una disminución en el contenido de UFC presentes en las hojas infectadas de *P. syringae*. Sin embargo en cuanto al porcentaje de daño, no existieron diferencias significativas respecto al control NNP. Del mismo modo, el tratamiento NRP, no mostró diferencias significativas en el porcentaje de daño ocasionado por la bacteria con respecto a NNP (Figura 55).

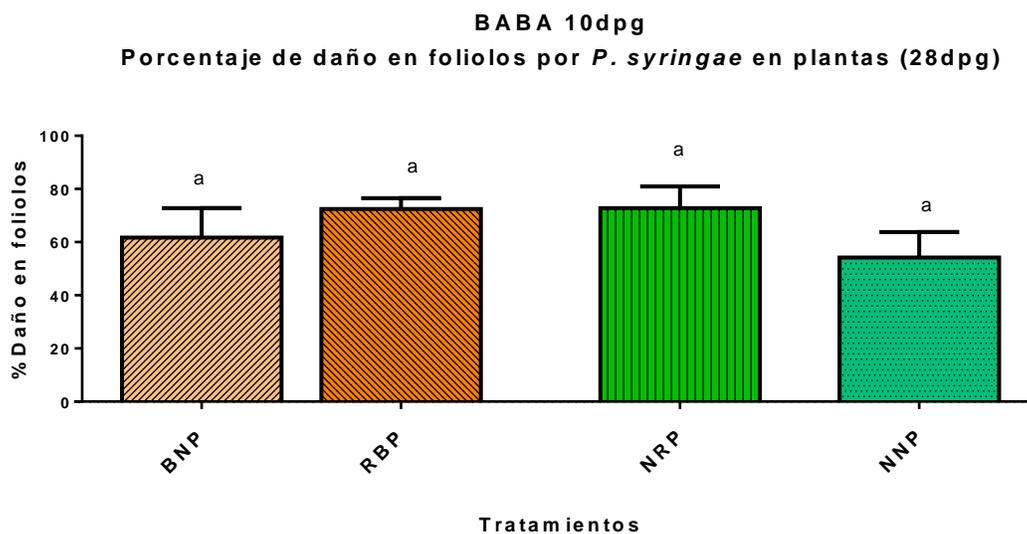


Figura 55. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 10 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. . Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 3 dpj

Los tratamientos {BR}P y NRP no mostraron diferencias significativas con respecto al control NNP, comportamiento que coincide con el contenido de UFC presentes en las hojas infectadas, donde la combinación simultánea de estos dos activadores generó una disminución en la defensa (Figura 56).

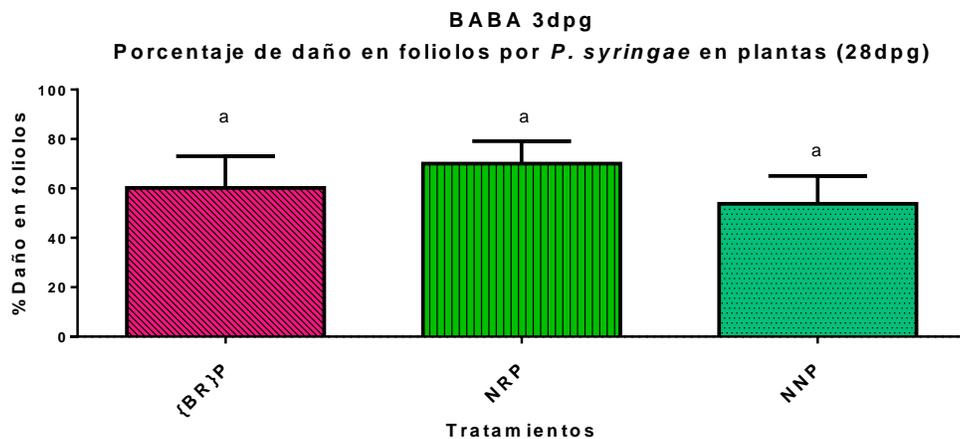


Figura 56. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

5.1.8 UFC de *R. tropici-Gus* de nódulos

Se contaron las colonias presentes en las cajas Petri con medio PY inoculadas con los nódulos molidos, que contenían albergado en su interior a *R. tropici*. Se emplearon las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} para inocular las cajas. Posteriormente, se realizaron conteos de las UFC presentes en cada dilución. En total se analizaron 14 datos por tratamiento de los conteos obtenidos. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y Tukey.

BABA 0 dpj

Los tratamiento BRN y NRP mostraron diferencias significativas en el contenido de UFC presentes en los nódulos con respecto al control NRN, por su parte BRP no mostró diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos (Figura 57). Por lo que, el

contenido las UFC presentes en los nódulos se mostraron afectados por la aplicación de BABA durante la germinación y la inoculación de *P. syringae* a los 17dpg de manera individual. En cambio, cuando se combinaron estos dos factores, este efecto es aminorado. De igual manera, este efecto puede ser observado al aplicar el logaritmo con base 10 a los resultados (Figura 58).

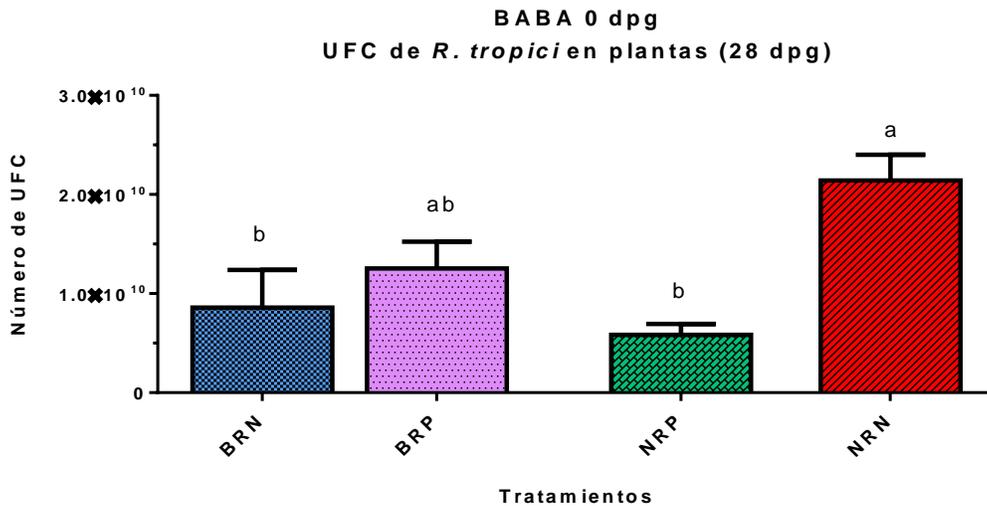


Figura 57. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 0 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P=0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

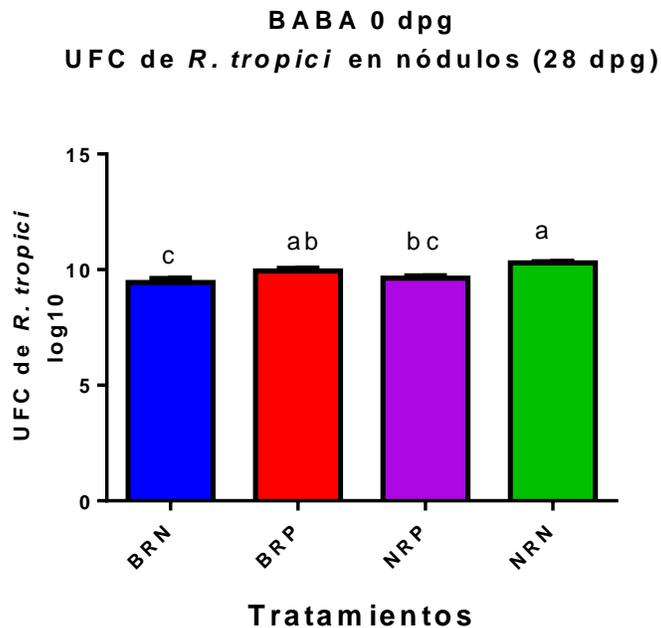


Figura 58. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 0 dpj con base log10, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 10 dpj

Los tratamientos RBN y RBP no mostraron diferencias significativas con respecto al control NRN, por su parte el tratamiento NRP, si mostro diferencias significativas. Por lo que, la secuencia de los factores en estos tratamientos no afecto el contenido bacteriano presente en los nódulos (Figura 59). Sin embargo, al analizar mis datos con base logarítmica de 10, encontramos que los tratamientos BNP, BRP y NRP cuentan con diferencias significativas con el control NRN (Figura 60).

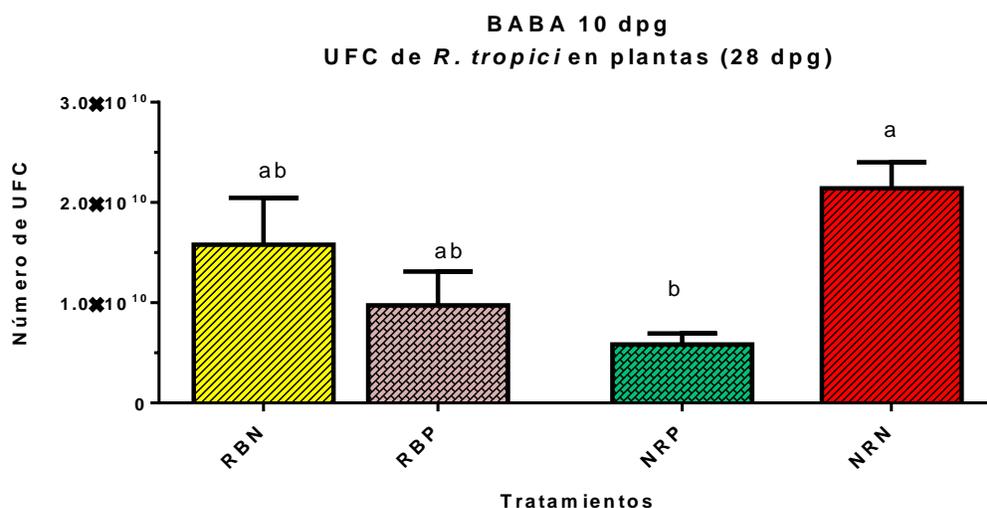


Figura 59. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 10 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 10 dpg
UFC de *R. tropici* en nódulos (28 dpg)

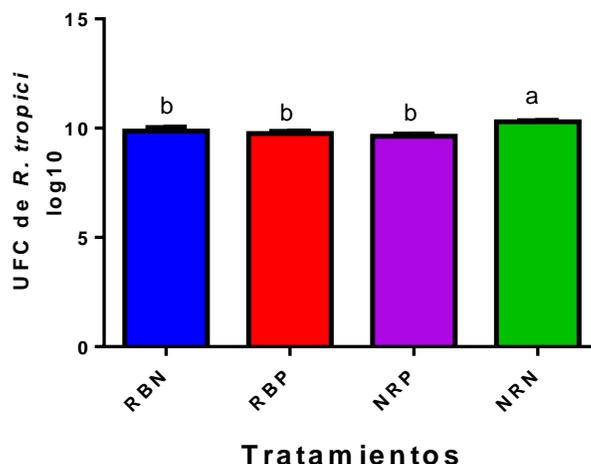


Figura 60. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 10 dpg con base log10, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 3 dpg

Los tratamientos {BR}N y {BR}P no mostraron diferencias significativas con respecto al control NRN, por lo que la aplicación simultánea en el mismo día de la inoculación de *R. tropici* en las raíces no interrumpe el ciclo de infección de la bacteria, aun cuando BABA también está siendo aplicado en las raíces. Por lo que además, podemos intuir que BABA no está actuando como un bactericida (Figura 61). Además, este efecto puede ser observado al analizar los datos de manera logarítmica con base 10 (Figura 62).

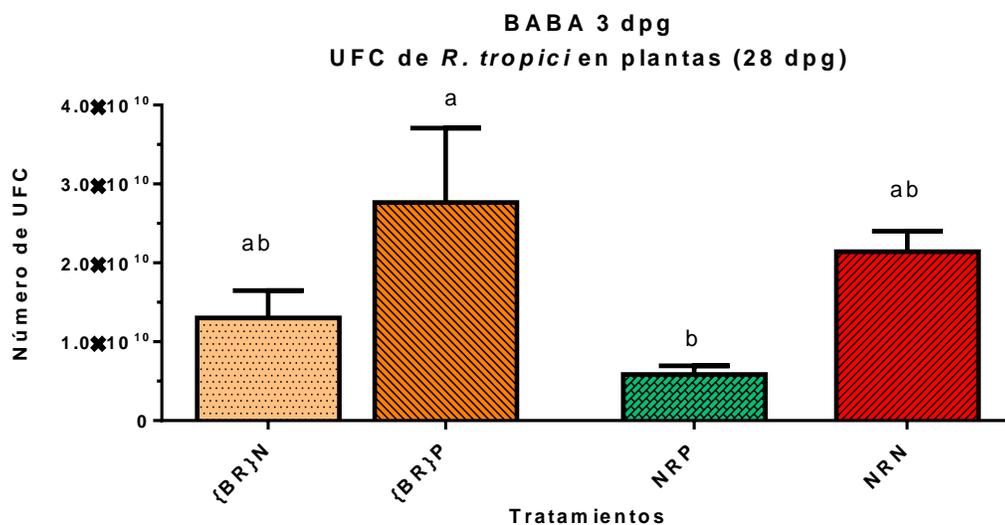


Figura 61. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 3 dpv, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

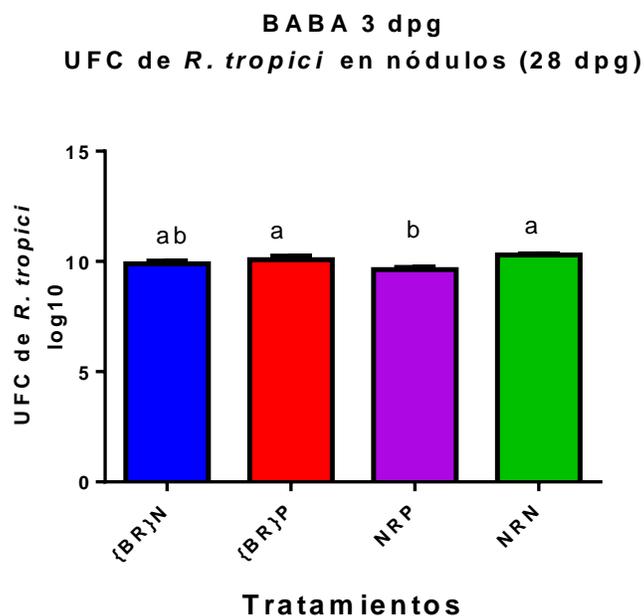


Figura 62. Número de UFC de *R. tropici* en nódulos en el modelo de BABA 3 dpv con base log₁₀, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras

iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

5.1.9 Número de nódulos

Se contaron el número total de nódulos presentes en las raíces de 9 plantas de cada tratamiento. Con base en los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía y Tukey.

BABA 0 dpj

Los tratamientos BRN, BRP y NRP no mostraron diferencias significativas en el número de nódulos presentes en las raíces de las plantas a los 28dpj con respecto a NRN. Por lo que la secuencia de aplicación de estos activadores de defensa, no tuvieron un efecto directo sobre la nodulación (Figura 63).

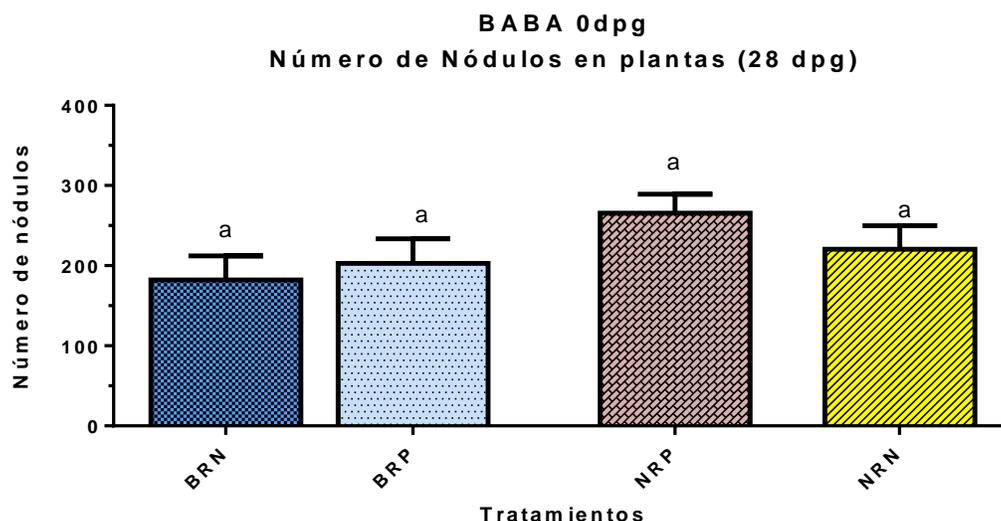


Figura 63. Número de nódulos presentes en las raíces de las plantas inoculadas con *R. tropici*, en el modelo BABA 0 dpj y con la inoculación de *P. syringae* en el primer trifolío. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

BABA 10 dpj

De igual manera, que el modelo de BABA 0 dpj, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos RBN, RBP y NRN en cuanto al número de nódulos presentes en las raíces con respecto al control NRN (Figura 64).

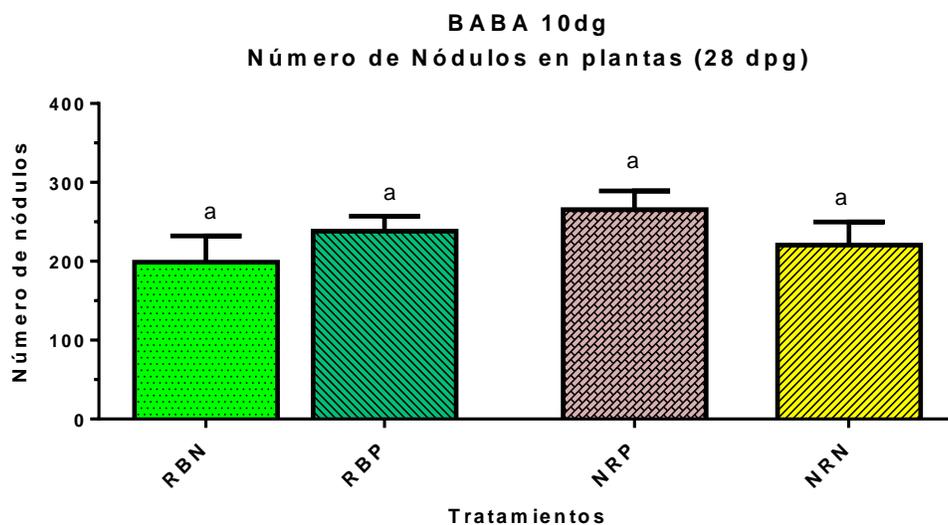


Figura 64. Número de nódulos presentes en las raíces de las plantas inoculadas con *R. tropici*, en el modelo BABA 10 dpj y con la inoculación de *P. syringae* en el primer trifolio. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

BABA 3 dpj

El tratamiento {BR}N mostró diferencias significativas respecto a {BR}P. Sin embargo, no mostró diferencias significativas con NRN y NRP. Por lo que, la aplicación simultanea de estos dos activadores y la posterior infección de *P. syringae* provoca una compensación ante este efecto de disminución en el número de nódulos (Figura 65).

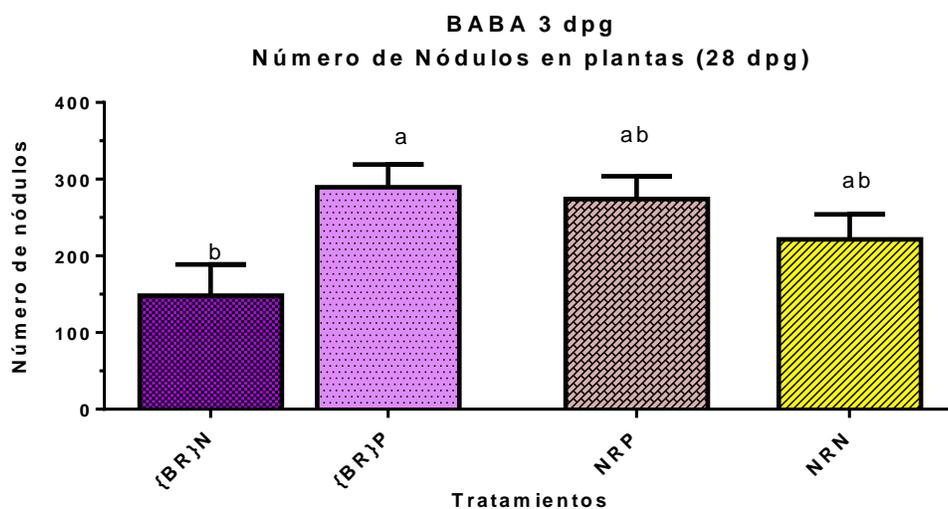


Figura 65. Número de nódulos presentes en las raíces de las plantas inoculadas con *R. tropici*, en el modelo BABA 3 dpj y con la inoculación de *P. syringae* en el primer trifolio.

B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=7).

5.1.10 Diámetro de nódulos

Se realizó la medición del diámetro de los nódulos presentes en las raíces con un total de 155 nódulos. Con base en los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía y Tukey (Figura 66).

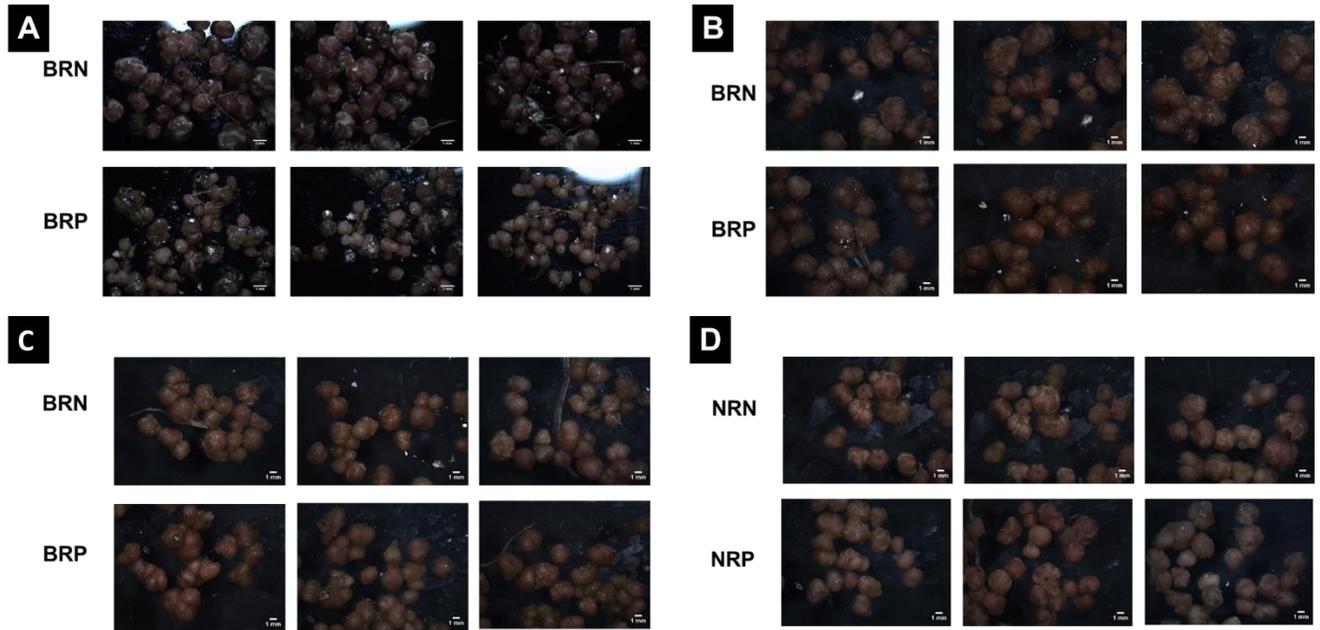


Figura 66. Paneles de fotos representativas de 3 plantas por cada tratamientos en los diferentes modelos empleado con respecto a los nódulos. A) BABA 0 dpq. B) BABA 10 dpq. C) BABA 3 dpq, D) Controles. Barra de escala= 1mm, n=155.

BABA 0 dpq

El tratamiento BRN mostró diferencias significativas en el diámetro de los nódulos con respecto a NRP y NRN, es decir, los nódulos presentes en este tratamiento mostraban un tamaño menor que los controles. A su vez, el tratamiento BRP, mostró diferencias significativas tanto con los controles NRP y NRN como con BRN. En pocas palabras, los nódulos presentes en el tratamiento BRP se mostraron con un tamaño mucho menor que los demás tratamientos (Figura 67).

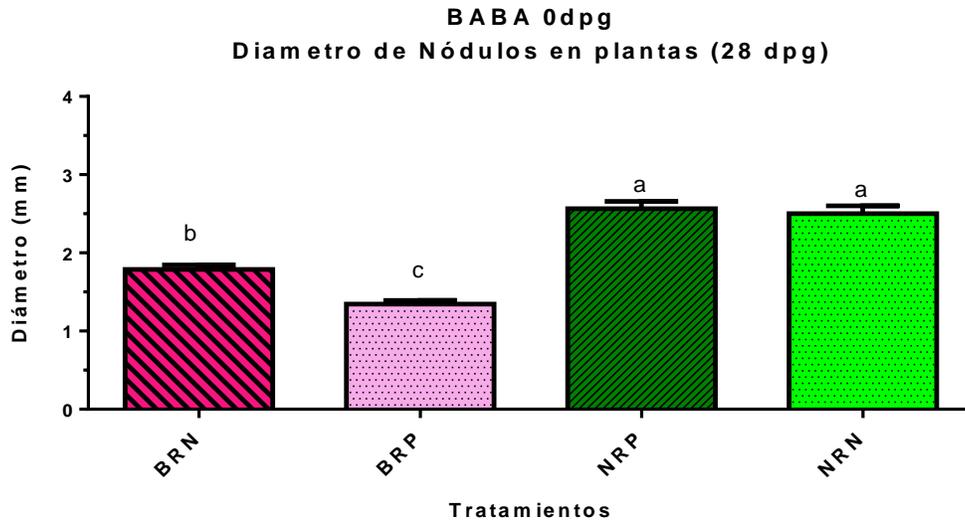


Figura 67. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

BABA 10 dpg

De manera contraria a lo observado en los tratamientos de BABA 0 dpg (BRN y BRP), los tratamientos RBN y RBP presentaron un mayor tamaño que los controles NRN y NRP. Por lo que los datos arrojaron diferencias significativas notables entre los tratamientos (Figura 68).

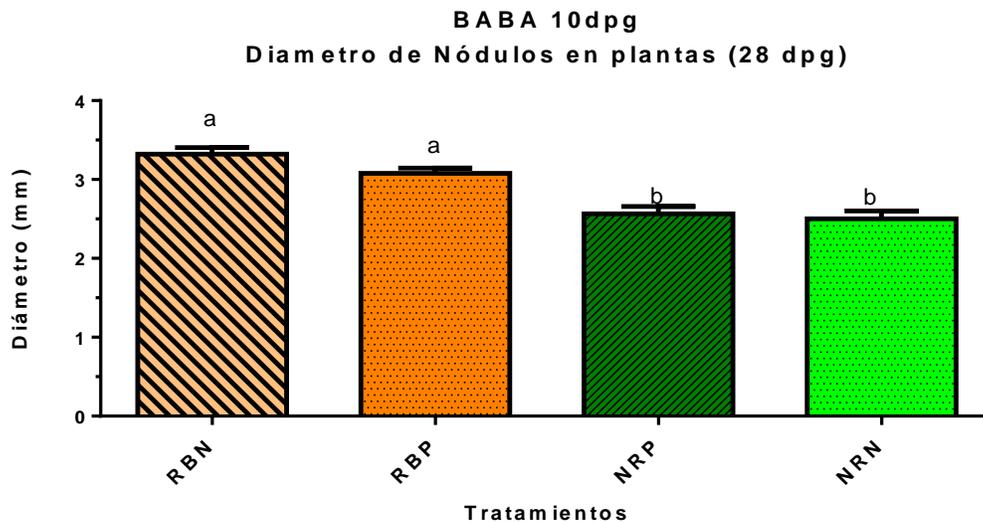


Figura 68. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpg, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-*

GUS, *P*= *P. syringae*, *N*= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

BABA 3 dpj

De igual manera que el modelo BABA 10 dpj, los tratamientos {BR}N y {BR}P mostraron un aumento en el diámetro de los nódulos presentes en las raíces de las plantas a comparación de los controles NRP y NRN (Figura 69).

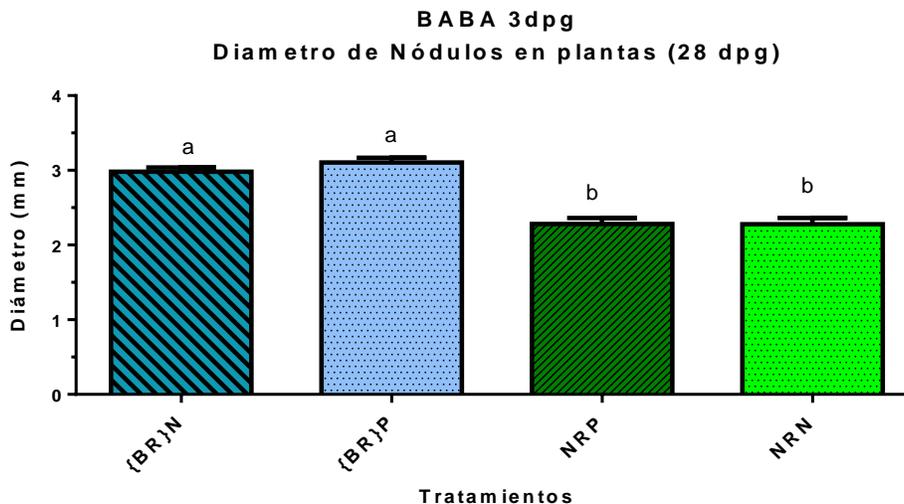


Figura 69. Porcentaje de daño en hojas infectadas con *P. syringae* en el modelo de BABA 3 dpj, así como los controles sin involucrar la aplicación de BABA. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, *P*= *P. syringae*, *N*= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=7$).

5.2OE2. Analizar la fijación de nitrógeno y morfología interna de nódulos en plantas tratadas con BABA e infectadas con *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

5.2.1 Reducción de acetileno

Con el fin de conocer de qué manera la aplicación de BABA pudiera afectar el rendimiento en función de la FBN en los nódulos, así como la infección con *P. syringae* pv. *phaseolicola* se evaluó la reducción de acetileno a etileno. El gas recolectado después de una hora de incubación con acetileno se midió en un cromatógrafo de gases (CG), obteniendo dos picos de respuesta, el primero correspondiente a etileno y el segundo con una abundancia mayor, al acetileno. En total se analizaron 3 plantas de cada tratamiento.

Los datos obtenidos de los cromatogramas, se analizaron de dos maneras: 1) La eficiencia de la FBN y; 2) La cantidad de nmoles fijados por peso fresco y número de nódulos presentes en la reacción.

Con base en los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico por ANOVA de dos vías, tomando en cuenta que todos los tratamientos han sido inoculados con *R. tropici*-GUS. Por lo que, el factor A fue considerado como BABA y el factor B a *P. syringae*. Posteriormente, se realizó el análisis de Tukey, para conocer el comportamiento de los grupos.

1) Eficiencia de la FBN

En este análisis los datos obtenidos de los nmoles de etileno se normalizaron por el peso fresco de los nódulos presentes, a valores de 1 g por tratamiento.

BABA 0 dpq

Los tratamientos BRN, BRP y NRP mostraron diferencias significativas respecto a NRN, lo que se traduce, en una reducción en la FBN por cada gramo de nódulo presente. Por lo que, la aplicación de BABA durante la germinación y la infección de *P. syringae*, genera una disminución en la fijación de nitrógeno por gramo de nódulos (Figura 70).

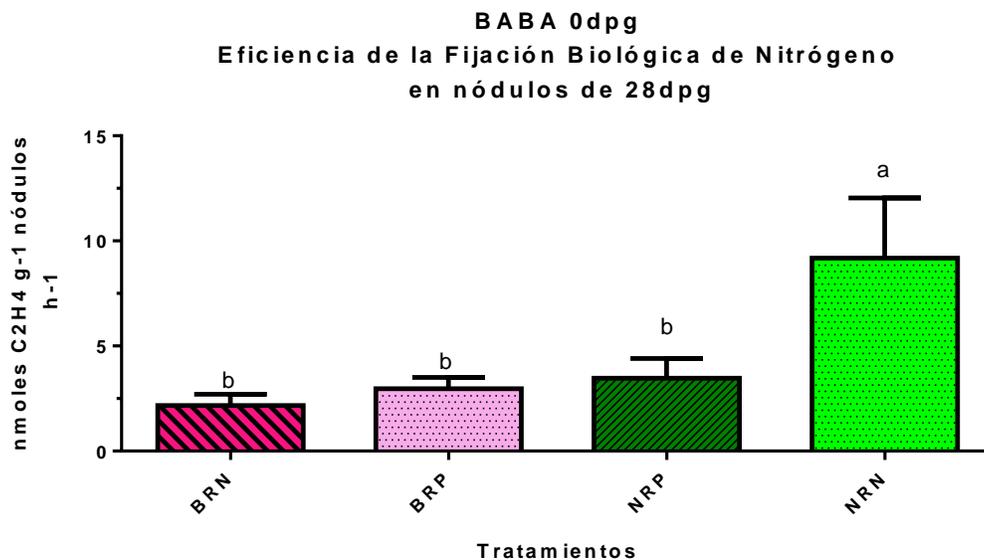


Figura 70. Eficiencia de la FBN por gramo de nódulos presentes en el modelo BABA 0 dpq. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=3$).

BABA 10 dpg

Los tratamientos RBN y RBP no mostraron diferencias significativas respecto al control NRN, sin embargo la tendencia de los datos en estos tratamientos se muestran menores que el control (Figura 71).

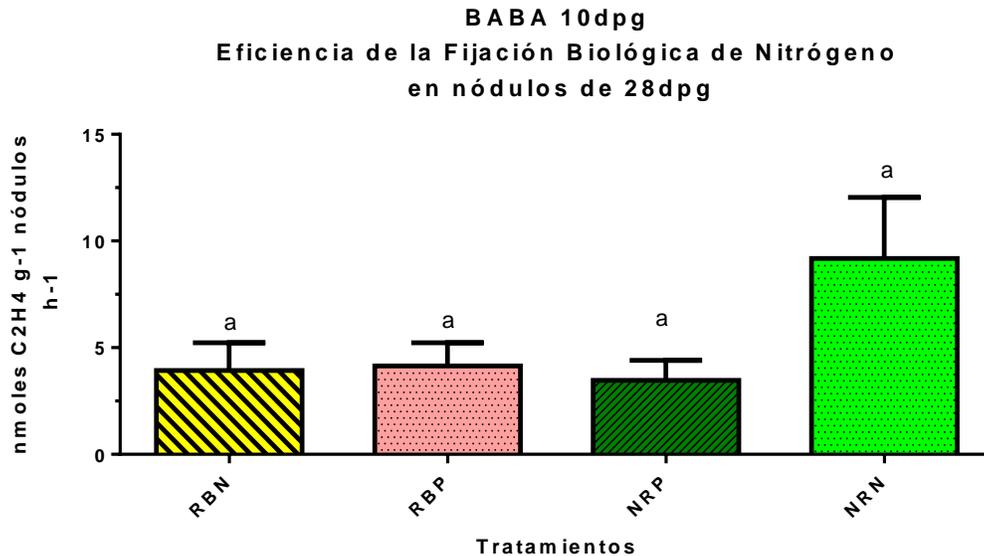


Figura 71. Eficiencia de la FBN por gramo de nódulos presentes en el modelo BABA 10 dpg. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=3$).

BABA 3 dpg

De igual manera que el modelo BABA 10 dpg, los tratamientos {BR}N y {BR}P no mostraron diferencias significativas con respecto al control NRN, sin embargo la tendencia de los datos se muestra menor a comparación de este control (Figura 72).

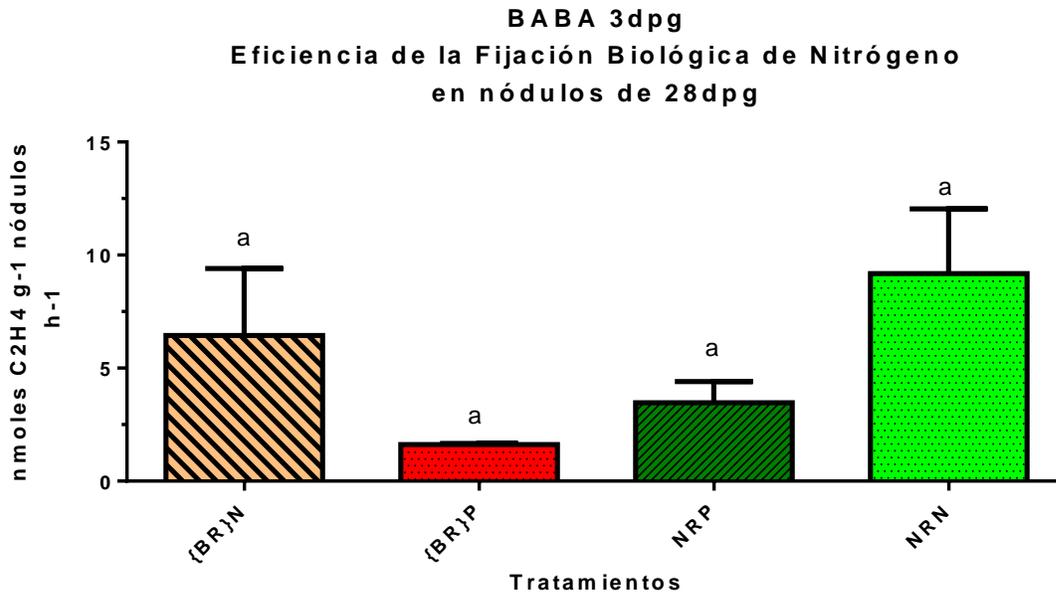


Figura 72. Eficiencia de la FBN por gramo de nódulos presentes en el modelo BABA 3 dpg. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=3).

2) Cantidad de nmoles fijados por peso fresco y número de nódulos presentes en la reacción

BABA 0 dpg

Se analizaron los datos crudos obtenidos de nmoles de etileno, con relación al peso fresco de los nódulos y al número de nódulos presentes. Generando dos gráficas, la primera con base en el número de nódulos presentes y el número de nmoles de etileno. Y la segunda con base en el peso fresco de los nódulos presentes durante la reacción de reducción de acetileno (Figura 73).

En la Figura 73, al analizar el total de fijación obtenido en las raíces noduladas por número de nódulos (o peso fresco de nódulos) encontramos que los tratamientos expuestos a BABA y/o *P. syringae*, presentaron una mayor fijación de nmoles de etileno que NRN.

Además, podemos observarlo claramente en el tratamiento BRN, encontrándose en la parte superior derecha de la gráfica, cuenta con un mayor número de nódulos y con una mayor cantidad de nmoles de etileno fijados a comparación de los demás tratamientos (Figura 73).

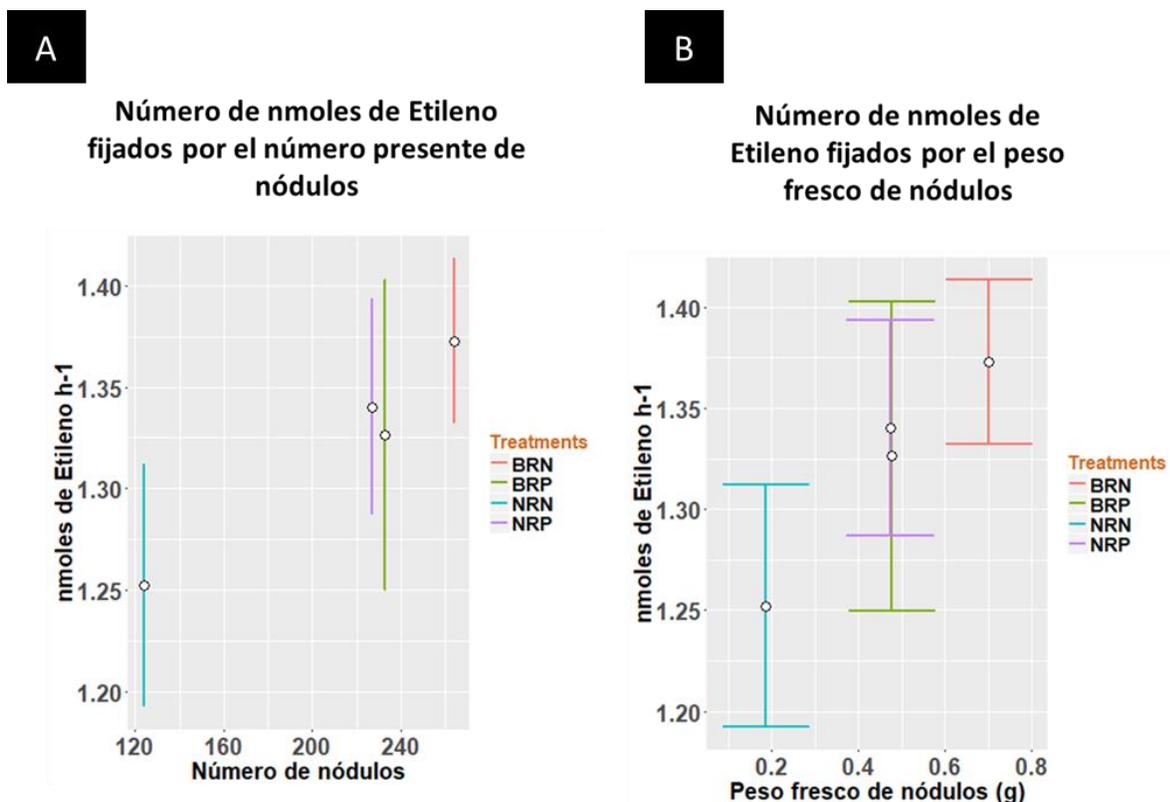


Figura 73. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número y peso fresco de los nódulos presentes en las raíces en el modelo BABA 0 dpq. **A)** Por número de nódulos presentes. **B)** Por peso fresco de nódulos. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=3).

Las barras de error que se muestran en la gráfica, se calcularon de acuerdo a la desviación estándar (SD) generada por los datos, por lo que para el bigote superior se resta el promedio de los nmoles menos el valor SD. A su vez, el bigote inferior resulta de la suma del valor promedio de los nmoles más el SD. Debido a lo anterior, los valores observados en la tabla se muestran muy pequeños, teniendo diferencias mínimas (Tabla 16).

Tabla 16. Datos promedios de la FBN a los 28 dpq en el modelo BABA 0 dpq.

Tratamientos	nmoles etileno	SD	Peso fresco (g)	Número de nódulos
BRN	1.3728	0.0407	0.7013	264
BRP	1.3264	0.0765	0.4776	233

NRN	1.2521	0.0599	0.187	124
NRP	1.3402	0.0534	0.4738	227

Por otra parte, podemos relacionar estos valores obtenidos con los datos previos analizados como son el número de nódulos, las UFC de *R. tropici* presentes en nódulos y el diámetro. Para lo cual, el tratamiento BRN, no presenta diferencias significativas entre el número de nódulos. Sin embargo, presenta una menor población bacteriana en los nódulos y un diámetro menor. Pero al coexistir en este conjunto funcional, los nódulos de este tratamiento presentan una mayor fijación en comparación a los demás tratamientos (Figura 74). De acuerdo a la Tabla 16, el tratamiento BRN fija 1.3728 nmoles de etileno en 264 nódulos.

Sin embargo, no debemos descartar que todos los tratamientos a los cuales se les adicionó, BABA y/o *P. syringae*, presentan una mayor fijación en términos globales en comparación del control NRN (Figura 74A).

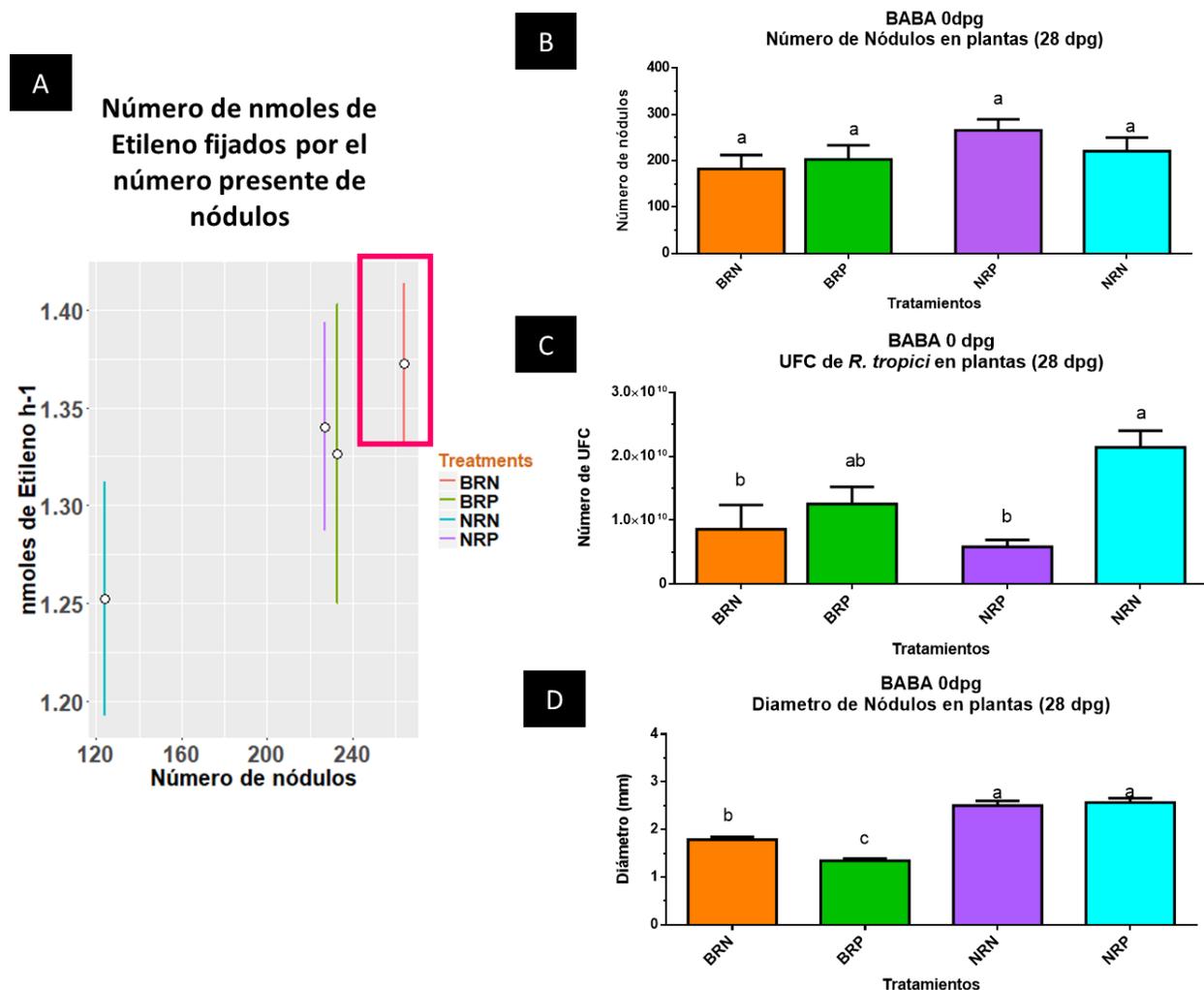


Figura 74. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número de nódulos en el modelo BABA 0 dpq. **A)** Número de nmoles de etileno por número de nódulos presentes. **B)** Número de nódulos. **C)** Número de UFC en nódulos. **D)** Diámetro de los nódulos. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=3$). Para fines prácticos las gráficas fueron pintadas de acuerdo al color de cada tratamiento en la gráfica 74A.

BABA 10 dpq

De igual manera que en BABA 0 dpq, se generaron dos gráficas, una relacionando el número de nódulos con el número de nmoles de etileno y otra relacionando el peso fresco de los nódulos con el número de nmoles de etileno (Figura 75).

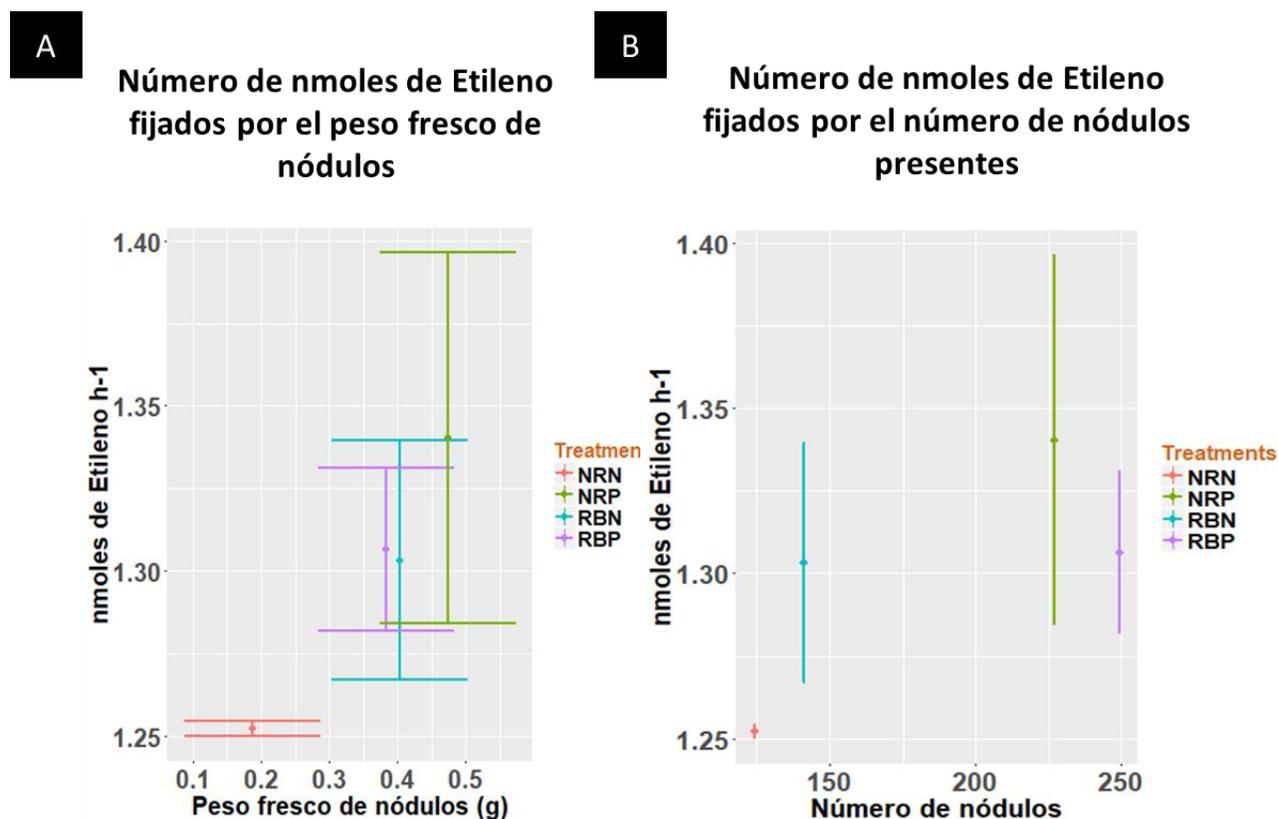


Figura 75. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número y peso fresco de los nódulos presentes en las raíces en el modelo BABA 10 dpq. **A)** Por número de nódulos presentes. **B)** Por peso fresco de nódulos. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=3$).

En este caso, el tratamiento que presentó una mayor fijación fue NRP a comparación de los demás tratamientos. Con un valor de 1.34023333 nmoles de etileno fijados en 227 nódulos en promedio (Tabla 17).

De acuerdo a la Tabla 17, el tratamiento NRP presentó una mayor fijación en comparación con los demás, sin embargo, contó con un menor número de nódulos a comparación del tratamiento RBP, el cual contenía 249 nódulos, pero presentaba un menor número de nmoles de etileno fijados.

El tratamiento NRP de acuerdo a los análisis previos, no cuenta con diferencias significativas de acuerdo al número de nódulos. Sin embargo, presenta un menor número de UFC dentro de los nódulos a comparación del control NRN, a su vez, el diámetro de sus nódulos no presentan diferencias significativas con respecto a NRN (Figura 76). De igual manera, debemos remarcar que los tratamientos presentes en este modelo, es decir, RBN y RBP, presentaron una mayor fijación global a comparación del control NRN (Figura 76A).

Tabla 17. Datos promedios de la FBN a los 28 dpq en el modelo BABA 10 dpq.

Tratamientos	nmoles de etileno	SD	Peso fresco (g)	Número de nódulos
RBN	1.30323333	0.03638164	0.40316667	141.333333
RBP	1.30633333	0.02466624	0.3835	249.333333
NRN	1.25213333	0.00228546	0.18703333	124.333333
NRP	1.34023333	0.05610119	0.4738	227

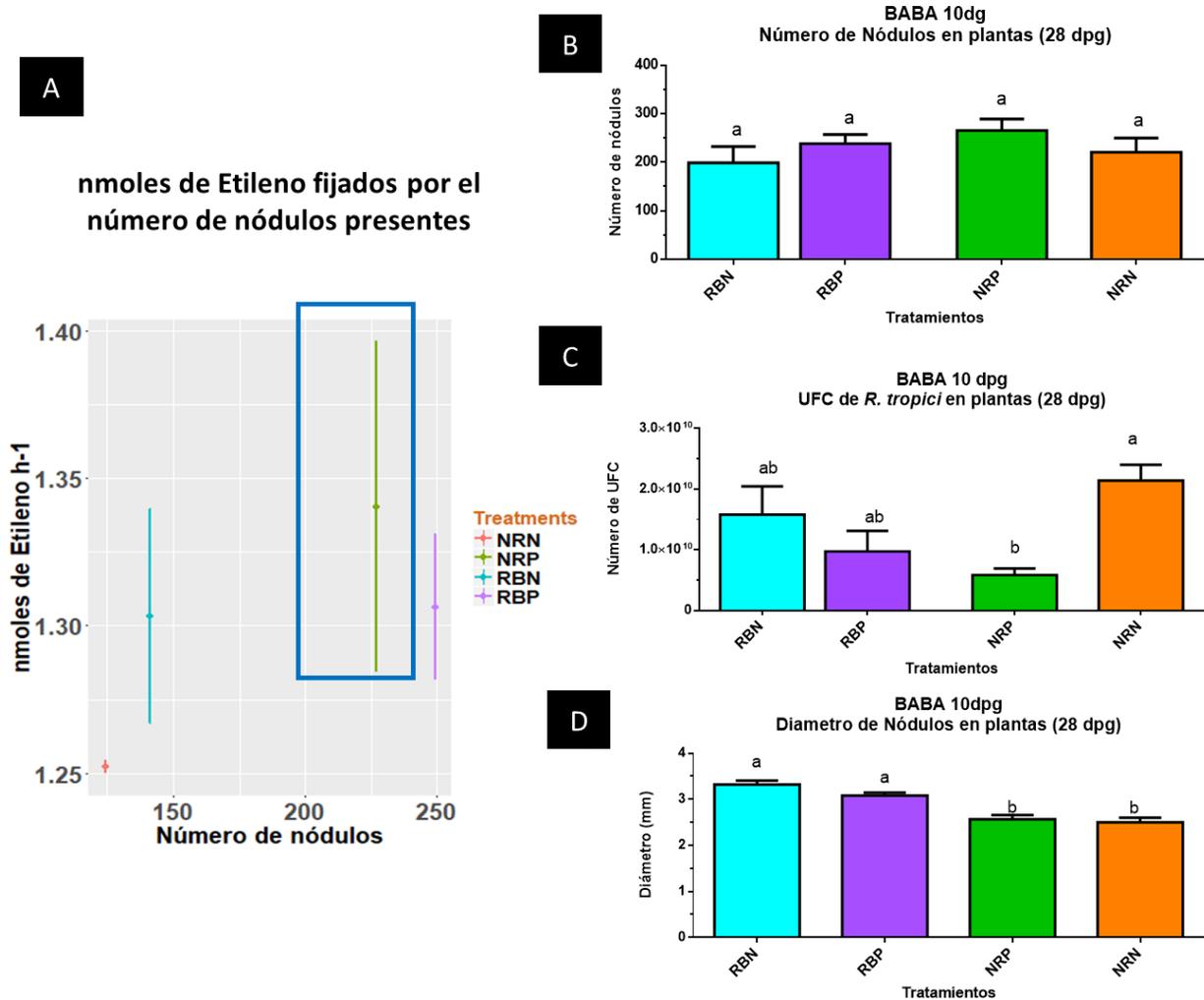


Figura 76. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número de nódulos en el modelo BABA 0 dpg. **A)** Número de nmoles de etileno por número de nódulos presentes. **B)** Número de nódulos. **C)** Número de UFC en nódulos. **D)** Diámetro de los nódulos. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media \pm SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P= 0.05$, prueba HSD-Tukey, $n=3$). Para fines prácticos las gráficas fueron pintadas de acuerdo al color de cada tratamiento en la gráfica 76A.

BABA 3 dpg

Se generaron dos gráficas, una relacionando el número de nódulos con el número de nmoles de etileno y el otro con relación al peso fresco de los nódulos (Figura 77). Por medio de la cual podemos señalar que las plantas del tratamiento {BR}P contaron con una mayor fijación, con un valor promedio de 1.4506 nmoles de etileno en 306 nódulos (Tabla 18). De acuerdo a la Tabla 18, como ya se mencionó el tratamiento que presentó una mayor fijación fue {BR}P, seguido por {BR}N con 1.3676 nmoles de etileno contando

con 155 nódulos. Uno pensaría que una mayor cantidad de nódulos equivaldría a una mayor fijación, pero si comparamos el tratamiento {BR}N y NRP observamos que la diferencia en la fijación entre ambos es mínima, {BR}N con 1.3672 nmoles de etileno y NRP con 1.3402 nmoles de etileno. Sin embargo, al comparar el número de nódulos el tratamiento NRP presentó 227 nódulos y {BR}N 155 nódulos. Por lo que el tratamiento NRP contó con una mayor cantidad de nódulos en comparación al tratamiento {BR}N, pero su fijación fue menor que el tratamiento {BR}N.

Además cabe destacar, que de acuerdo a los análisis previos este tratamiento no cuenta con diferencias significativas en el número de nódulos ni UFC presentes. Por su parte, los nódulos cuentan con un diámetro mayor a comparación del control NNN (Figura 78).

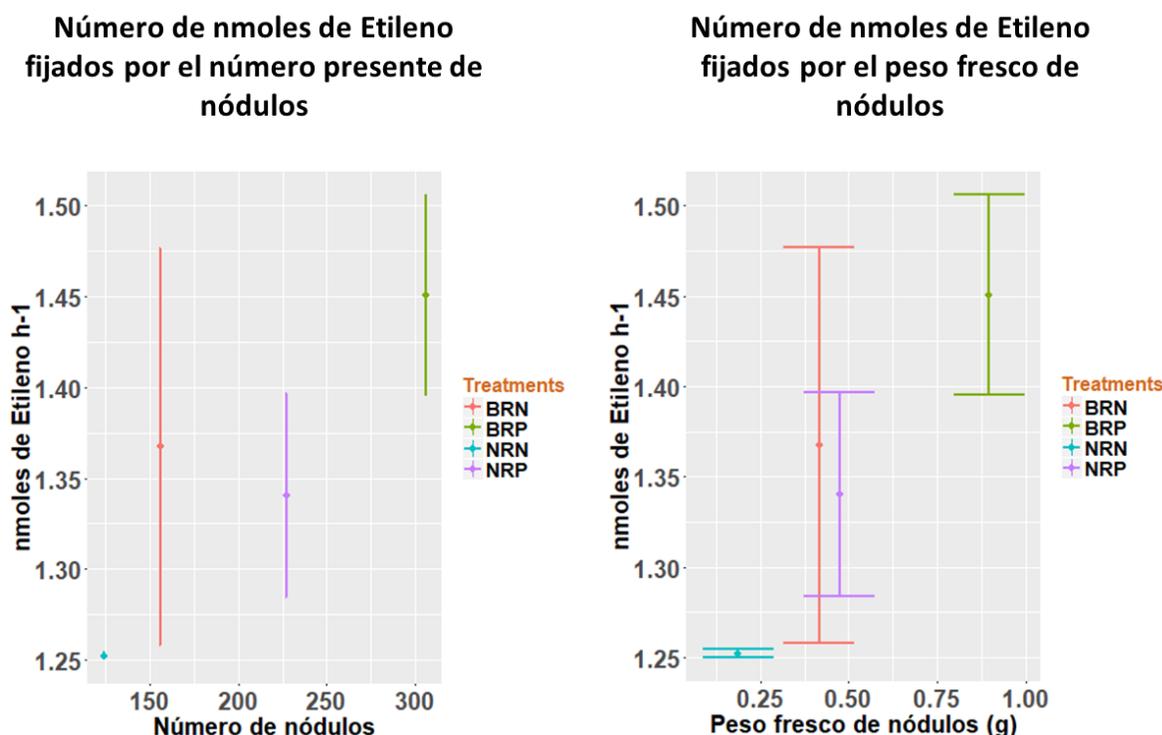


Figura 77. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número y peso fresco de los nódulos presentes en las raíces en el modelo BABA 10 dpq. **A)** Por número de nódulos presentes. **B)** Por peso fresco de nódulos. B=BABA, R=*R. tropici-GUS*, P=*P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=3).

Tabla 18. Datos promedios de la FBN a los 28 dpq en el modelo BABA 3 dpq

Tratamientos	nmoles de etileno	SD	Peso fresco (g)	Número de nódulos

{BR}N	1.3672	0.10939822	0.41603333	155.666667
{BR}P	1.45063333	0.05525127	0.8979	306
NRN	1.25213333	0.00228546	0.18703333	124.333333
NRP	1.34023333	0.05610119	0.4738	227

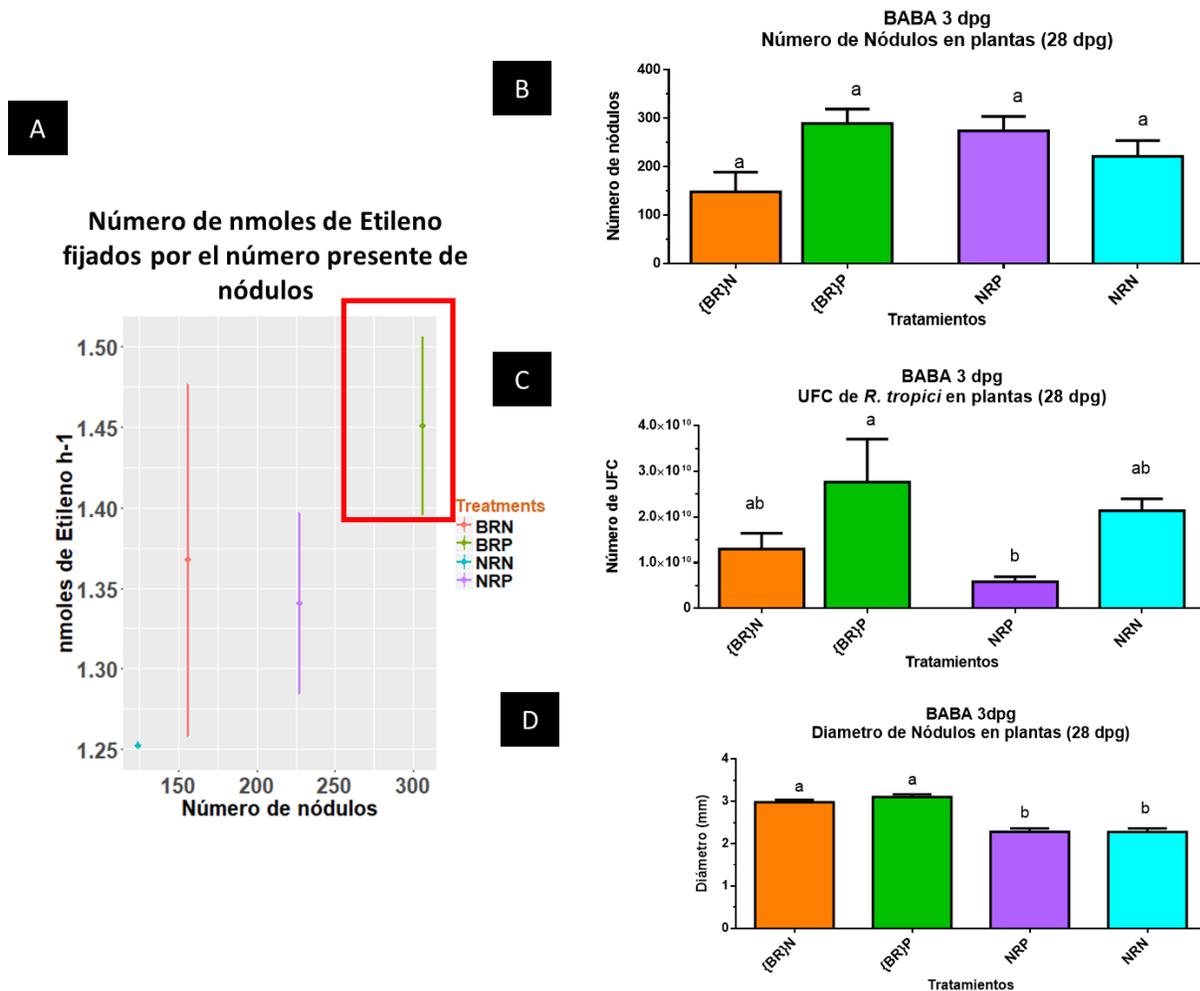


Figura 78. Número de nmoles de etileno obtenidos con la reducción de acetileno de acuerdo al número de nódulos en el modelo BABA 0 dpv. **A)** Número de nmoles de etileno por número de nódulos presentes. **B)** Número de nódulos. **C)** Número de UFC en nódulos. **D)** Diámetro de los nódulos. B=BABA, R=*R. tropici*-GUS, P= *P. syringae*, N= nulo. Las barras representan la media ± SEM. Letras iguales sobre las barras indican la falta de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P= 0.05, prueba HSD-Tukey, n=3). Para fines prácticos las gráficas fueron pintadas de acuerdo al color de cada tratamiento en la gráfica 78A.

5.2.2 Cortes histológicos

Protocolo de tinción de GUS

La cepa utilizada para la generación de los nódulos en las raíces *R. tropici*, contiene integrado en su genoma el gen de la enzima que codifica a la β -glucuronidasa proveniente de *Escherichia coli*, Por lo que, al realizar la incubación por 24 horas de los nódulos en un buffer con presencia de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-1H-indol-3-ilo-D-glucopiranosidurónico), los nódulos presentan una coloración azul. El producto de la acción de la enzima glucuronidasa sobre X-Gluc no genera una coloración, siendo la coloración el producto de la dimerización oxidativa de los derivados indoxilo producidos (Jefferson, 1987). De este modo, podemos observar de manera visible las células infectadas por nuestra bacteria dentro de los nódulos.

La técnica de tinciones con GUS se estandarizó con las muestras obtenidas del tratamiento BABA 0 dpv y controles a una edad de 28 dpv. Por lo que, se contó con nódulos de los tratamientos BRN, BRP, NRN y NRP. Una vez realizadas las tinciones con GUS, el tejido fue montado en los bloques de Technovit. Se utilizaron 10 nódulos por planta, empleando 3 plantas por tratamientos.

Los cortes de los bloques se realizaron en 8 μm cada uno. Se observó la morfología interna de cada nódulo tomando en cuenta las células infectadas, la morfología de los haces vasculares y el tamaño de los nódulos.

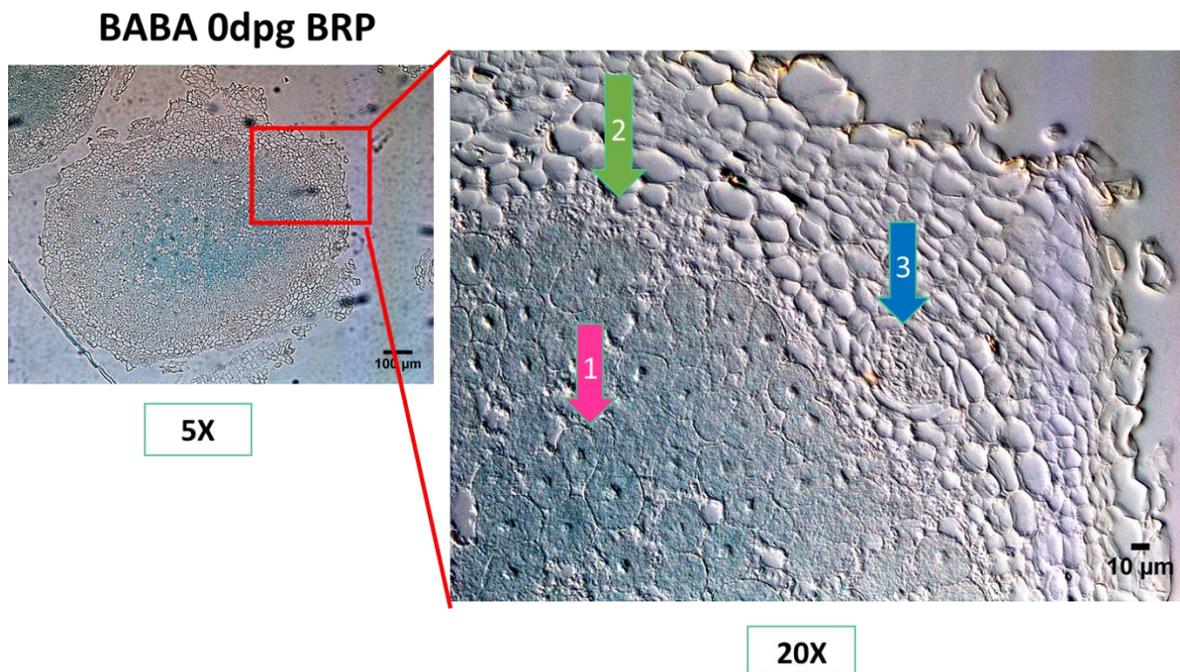


Figura 79. Cortes histológicos de nódulos a los 28 dpv del modelo BABA 0 dpv, con tinciones GUS específicas para detección de las células infectadas por *R. tropici*-GUS. Magnificaciones a 5X y 20 X. Barra de escala en 5X= 100 µm y 20X= 10 µm.

En la Figura 77, podemos identificar las células infectadas con *R. tropici* (1) las cuales presentan un abultamiento en el centro característico de la membrana peribacteroidal donde se encuentran las bacterias endófitas de *R. tropici* (o bacteroides). Por su parte, podemos identificar la acumulación de amiloplastos (2) y la estructura de los haces vasculares (3).

Sin embargo, aún faltaría realizar las tinciones de GUS correspondientes a los tratamientos BABA 10 dpv y BABA 3 dpv.

Protocolo de fijación en paraplast

Para distinguir con mayor facilidad las posibles diferencias que pudieran existir entre los diversos tratamientos se planea utilizar las reacciones histoquímicas o tinciones específicas para carbohidratos, como es la reacción conocida como PAS, la cual genera una combinación rojiza al combinar el ácido peryódico con el reactivo de Schiff. Actualmente, se cuentan con algunos bloques, por lo que resta comprobar la correcta fijación de los nódulos en Paraplast y los tiempos de tinción de estos reactivos.

5.3 OE3. Determinar la expresión de genes de defensa en hojas, raíces y nódulos de plantas de frijol primadas con BABA durante la infección de *P. syringae* pv *phaseolicola*.

Con base en los análisis generados con respecto al número de UFC y porcentaje de daño ocasionado por *P. syringae*, así como a la interacción generada entre BABA y *R. tropici*, se ha determinado que el tratamiento BABA 10 dpv, es el tratamiento más adecuado y con características que pudieran definir este fenómeno como un sinergismo contra *P. syringae*.

Una vez corroborada la defensa local inducida por BABA y *R. tropici*, ahora se busca conocer si existe una defensa sistémica en la planta (por ejemplo, en el segundo trifolio, el cual no ha sido inoculado con *P. syringae*). Para ello se ha recolectado tejido de cada tratamiento, para realizar el análisis de expresión.

Las tomas de muestra que han sido empleadas son las que se muestran en la Figura 80, en donde podemos destacar las colectas un día antes de aplicar BABA (9 dpv), un día después de su aplicación (11 dpv), recordando que su aplicación se realiza por riego en el sustrato. Por su parte, contamos con tomas con un día antes de la infección con *P.*

syringae (16 dpj), un día, tres y cinco días después de la infección (18 dpj, 20 dpj y 22dpj, respectivamente). En los cuales ya tenemos el primero y segundo trifolios formado.

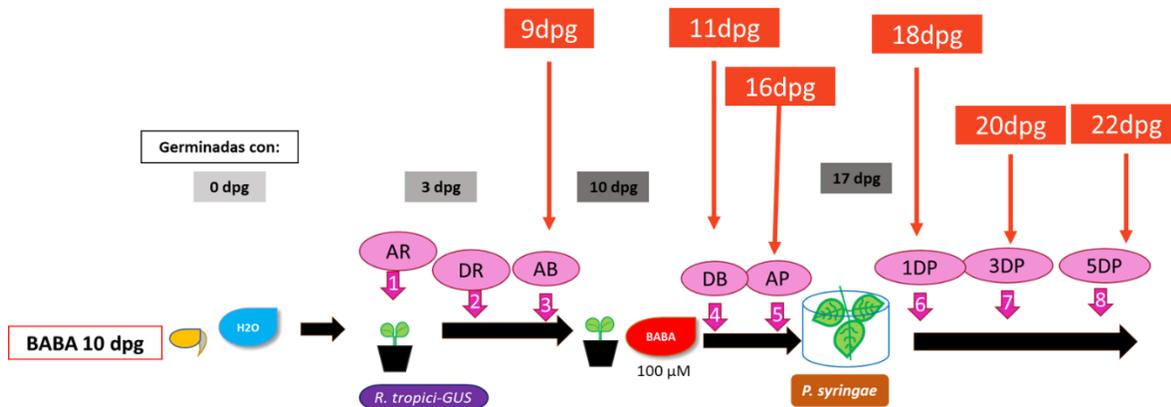


Figura 80. Tomas de muestras realizadas en el tratamiento BABA 10 dpj.

Posteriormente, se realizaron pruebas iniciales de expresión por medio de PCR semi-cuantitativa o PCR punto final, con diferentes oligonucleótidos en los tres tejidos recolectados: hojas, raíces y nódulos. Los genes analizados fueron *PvPR1*, *PvNRP3*, *Pvibs2*, *PvSymRK*, *PvPDF1.2* (3 pares), *PvMYC2* (2 pares), *PvWRKY33*, *PvPR10*, *PvERF6*, *PvPAL2* y *PvLOX1_5*. Como genes de referencia se emplearon *PvEF-α*, *PvActina11* y *PvTUBA* (Tabla 14).

Se empleó el tratamiento NRN a los 16 dpj para este análisis inicial. Se realizó un gradiente para analizar la mejor temperatura de amplificación por par de oligonucleótidos. Así, se seleccionó la temperatura de 58°C para todas las muestras con base en las amplificaciones obtenidas (Figura 81).

valores del Melt Curve y los $\Delta\Delta CT$ arrojados por el equipo. Obteniendo las siguientes gráficas de amplificación de los genes (Figura 83).

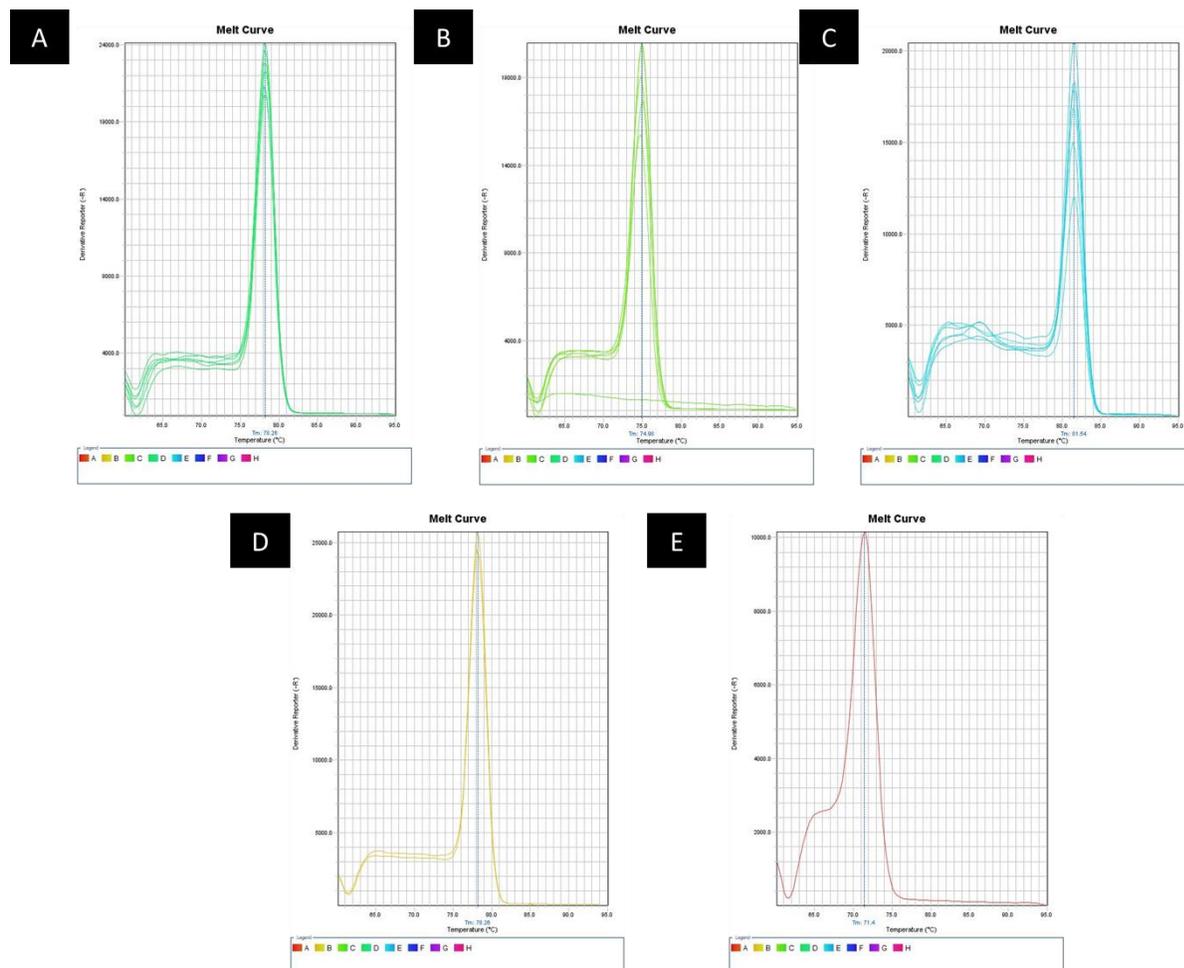


Figura 83. Curva de amplificación de los genes de interés en las hojas del tratamiento control NNN en las temperaturas 55, 58 y 61°C. **A)** *PvPR1*. **B)** *PvMYC2*. **C)** *PvWRKY33*. **D)** *PvActina11*. **E)** *PvTUBA*.

La estandarización y los tiempo ya se encuentran corroborados, restando solamente el realizar las 680 reacciones necesarias para analizar los distintos tiempos de muestra del tratamiento BABA 10 dpg con sus respectivos controles.

VI. DISCUSIÓN

La aplicación de BABA a una concentración de 100 μM durante la germinación no afecta el desarrollo de la raíz, tanto su tamaño como el número de raíces secundarias formadas durante estas etapas tempranas del desarrollo son normales. Además, tampoco mostró un efecto directo en el tamaño del hipocótilo.

Al analizar las plantas germinadas con BABA 100 μM a los 28 dpj (BABA 0 dpj), encontramos que no existieron diferencias significativas con respecto a la **altura, largo de la raíz principal, peso fresco de la parte aérea y raíces** entre los tratamientos BNN y BNP con respecto a los controles NNN. Sin embargo la presencia de *R. tropici* en los diferentes tratamientos provocó una disminución en estas variables. Ya sea con la inoculación por sí solo de *R. tropici* o en combinación con BABA y/o *P. syringae*. Obteniendo plantas más pequeñas en los tratamientos BRN, BRP, NRN y NRP. Este mismo comportamiento fue observado en los tratamientos BABA 10 dpj (RBN y RBP) y BABA 3 dpj (BRN y BRP).

Un factor importante a tomar en cuenta fue la diferencia en el riego realizado, ya que los tratamientos que fueron inoculados con *R. tropici*, fueron privados en la totalidad de una fuente de nitrógeno que no fuera la generada por la propia simbiosis; es decir, la solución B&D no se le añadió KNO_3 . En cambio a las plantas que no fueron inoculadas, contaban con una concentración de 8 mM de KNO_3 durante las fertilizaciones. En promedio, se ha estimado que el frijol común bajo condiciones naturales durante la simbiosis, no obtiene más del 50% de sus necesidades de nitrógeno (Peña-Cabriales & Grageda-Cabrera, Dinámica del nitrógeno en el ecosistema agrícola., 1999), en las condiciones biogeográficas presentes en Guanajuato.

Además, el tratamiento donde sólo se inoculó con *P. syringae*, es decir NNP, no presentó diferencias significativas en la **altura, largo de la raíz principal, peso fresco de la parte aérea y raíces** con respecto al control NNN. Por lo que, este comportamiento de disminución en estas variables puede ser atribuido al bajo contenido de nitrógeno disponible que se proporciona durante las fertilizaciones a los tratamientos a los cuales se les ha inoculado *R. tropici*.

Por otra parte, el tratamiento BNP del modelo BABA 10 dpj, presentó una altura mayor respecto al control NNN, atribuyendo este efecto a la secuencia de aplicación de los factores, es decir, BABA 10 dpj y *P. syringae* a los 17 dpj. Y no sólo a la presencia de BABA, ya que se ha demostrado que a pesar de que BABA es un aminoácido no proteico, por lo que es un compuesto que no puede ser asimilado por la planta, si no simplemente es trasladado en los tejidos (Cohen & Gisi, 1994). En un estudio en el cual se aplicó ^{14}C -BABA, se logró volver a extraer de hojas de tomate el 96% de la cantidad aplicada inicial, sugiriendo que BABA no es un compuesto metabolizado (Cohen & Gisi, 1994). El 4%

restante fue etiquetado como insoluble, localizado en proteínas de las paredes celulares de las plantas, sugiriendo que este compuesto se incorpora en los complejos proteína-carbohidrato (Cohen & Gisi, 1994). Además, se ha demostrado que BABA se sintetiza de manera endógena, encontrando que su concentración relativa en la planta se encuentra relacionada con la activación de defensa tipo PTI (Bacelli, Glauser, & Maunch-Mani, 2017).

En cuanto a términos de defensa, el tratamiento BRP del modelo BABA 0 dpg no presentó diferencias significativas en cuanto al número **UFC de *P. syringae*** en comparación al control NNP. Por lo que, la combinación de BABA durante la germinación y posterior inoculación con *R. tropici* a los 3 dpg, genera una respuesta antagónica entre las vías de defensa de SAR e ISR, viéndose reflejado en la proliferación de esta bacteria hemibiotrófica en las hojas infectadas. Sin embargo, el tratamiento BNP presentó una disminución en la cantidad de UFC en las hojas infectadas, por lo que la aplicación de BABA durante la germinación y el posterior enfrentamiento con *P. syringae* incrementa la defensa de las plantas.

Por su parte, las combinaciones RBP y BNP en el modelo BABA 10 dpg presentaron diferencias significativas respecto a NNP. Por lo que, esta combinación RBP, en donde primero se inoculó *R. tropici* a los 3 dpg, y que posteriormente se regó con 50 mL de BABA 100 μ M, muestra un sinergismo entre BABA y *R. tropici* al aumentar la defensa contra este patógeno reduciendo el número de UFC en las hojas infectadas, contando con diferencias significativas al tratamiento BNP.

En el laboratorio se ha analizado la aplicación de BABA a los 10 dpg con la misma concentración empleada en este trabajo (de 100 μ M) en plantas de frijol variedad BAT93, la cual es una variedad que se ha descrito como resistente a *P. syringae*. Demostrando que bajo estas condiciones, BABA induce la defensa contra este patógeno (Martínez-Aguilar, Ramírez-Carrasco, Hernández-Chávez, Barraza, & Álvarez-Venegas, 2016). Así, en este trabajo también pudimos comprobar el efecto generado por BABA en la inducción de la defensa contra *P. syringae* en una variedad descrita como susceptible a este patógeno, BAT477.

La combinación simultánea aplicada a los 3 dpg con BABA y *R. tropici* en plántulas de frijol ({BR}P), no mostró diferencias significativas con NNP. Generando como resultado una disminución en la defensa y un aumento en la proliferación bacteriana de *P. syringae* en las hojas infectadas.

Por lo que, al observar los comportamientos obtenidos en BRP (BABA 0 dpg), RBP (BABA 10 dpg) y {BR}P (BABA 3 dpg), podemos indicar que aun utilizando la misma concentración de BABA, *R. tropici* y *P. syringae* en los tratamientos, el comportamiento mostrado en el aumento o disminución de la defensa dependió de la etapa biológica de la planta y la secuencia de aplicación en la cual fueron incorporados estos factores.

Demostrando que no todo está escrito, ya que la interacción entre las vías de defensa dependerá de las hormonas involucradas, del tiempo y la secuencia de aplicación (Caarls, Pieterse, & Van Wees, 2015; Koornneef, et al., 2008; Liu, et al., 2016; Mur, Kenton, Atzorn, Miersch, & Wasternack, 2006; Timmermann, et al., 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que el nivel de protección depende de la cantidad de BABA que es traslocada a los tejidos, lo que sugiere que la resistencia depende de la presencia real de BABA en el tejido foliar (Cohen & Gisi, 1994). Además, se ha encontrado que BABA se acumula después del reconocimiento y activación de la defensa PTI en los tejidos donde se ha inoculado *Pst DC 3000* (Bacelli, Glauser, & Maunch-Mani, 2017).

En cuanto al **porcentaje de daño**, no se observaron diferencias significativas en la presencia de la clorosis y la necrosis en las hojas infectadas con *P. syringae*. Esto difiere con lo obtenido por Martínez-Aguilar y colaboradores en el 2016, pudiéndose atribuir este efecto con el tipo de resistencia en la variedad que ellos emplearon. Además, de diferir en la forma en la cual fue inoculado *P. syringae*, ellos lo han aplicado por infiltración en las hojas lo cual generó HR en la parte infiltrada y una zona de necrosis específica. Por su parte, nosotros sumergimos la hoja, lo cual generó más puntos de necrosis y clorosis por parte en la bacteria en toda el área de la hoja.

La traslocación de BABA dentro de la planta se mueve en ambas direcciones, tanto a la parte foliar como a las raíces (Cohen & Gisi, 1994). Debido a lo anterior, fue importante conocer de qué manera BABA pudiera influir en la formación de nódulos funcionales en las raíces.

Los tratamientos BRN y BRP (BABA 0 dpq), RBN y BRP (BABA 10 dpq) y {BR}N y {BR}P (BABA 3 dpq) no presentaron diferencias significativas en cuanto al **número de nódulos** presentes en las raíces. Sin embargo, los tratamientos {BR}N y {BR}P en el modelo BABA 3 dpq presentaron diferencias entre ellos, donde el tratamiento {BR}P mostró un mayor número de nódulos a diferencia de {BR}N.

La variedad BAT477 ha sido reportada como tolerante a la desecación, muy buena fijadora de nitrógeno y con un rendimiento mayor en la fijación cuando hay desecación (Sponchiado, White, Castillo, & Jones, 1989; Hardarson, et al., 1973; Castellanos, Peña-Cabriales, & Acosta-Gallegos, 1996; Peña-Cabriales & Castellanos, 1993). Aunado a esto, Tang y colaboradores (2001) reportaron que la variedad BAT477 al ser inoculadas con *R. tropici*, presentaba 60 nódulos en promedio por planta. Comparando este dato con los resultados que se obtuvieron, las plantas que solo han sido inoculadas con *R. tropici* (NRN) contaron con un promedio de 220 nódulos por planta. Por lo que, las condiciones biogeográficas presentes en nuestro lugar de análisis han sido idóneas para el desarrollo de nódulos en BAT477.

Analizando los datos obtenidos en cuanto al **número de UFC de *R. tropici*** presentes en los nódulos, pudimos observar que los tratamientos BRN y NRP presentaron diferencias significativas con respecto a NRN, en el modelo BABA 0 dpq. Por su parte, el tratamiento BRP no mostró diferencias con los demás tratamientos. Por lo que, podemos atribuir este comportamiento a la combinación de estos dos factores BABA y *P. syringae* en este modelo. Por otro lado, en el modelo BABA 10 dpq, los tratamientos RBN y RBP no mostraron diferencias significativas con respecto a NRN, por lo que el contenido de bacteria presentes en los nódulos no se observó afectado por BABA ni por *P. syringae*. De igual manera, los tratamientos {BR}N y {BR}P del modelo BABA 3 dpq, no mostraron una disminución en el número de UFC presentes en los nódulos.

Así, solo el tratamiento BRN donde previamente se ha inducido la defensa por parte de BABA, en el modelo BABA 0 dpq, ha mostrado afectar el contenido de bacterias presentes en los nódulos, más no el número de nódulos por planta. Los demás tratamientos por su parte no se mostraron afectados en el número de nódulos ni en el contenido de bacterias presentes.

La reducción en el contenido de UFC de *R. tropici* presentes en los nódulos al infectar con *P. syringae*, es decir el tratamiento NRP, sugiere que existe una interacción entre la deficiencia en la fotosíntesis ocasionada por la faseolotoxina producida por *P. syringae* y el movimiento de los fotosintatos hacia los nódulos. Al existir una disminución en la fotosíntesis producto de la inhibición de la enzima ornitil carbamoiltransferasa (Arvizu-Gómez, 2011; Mitchell, Bean halo-blight toxin, 1976; Mitchell, 1976), hipotetizamos que la planta ya no es capaz de producir los fotosintatos necesarios para cumplir con la demanda generada por la FBN en los nódulos, por lo que la presencia bacteriana es menor en los nódulos.

Por otro lado, los tratamientos BRN y BRP (del modelo BABA 0 dpq) presentaron una disminución en el **diámetro de los nódulos** respecto a NRN y NRP, por lo que los nódulos de estos tratamientos fueron más pequeños. El tratamiento que se mostró más afectado debido a la secuencia en la combinación de los factores fue BRP, donde el diámetro de los nódulos fue significativamente menor que los nódulos del tratamiento BRN, atribuyendo este efecto a la infección por *P. syringae*. Por su parte, el tratamiento NRP, no mostró diferencias significativas respecto a NRN, es decir, que el efecto en la disminución del tamaño de los nódulos no puede ser solo enfocada a la infección por *P. syringae*.

En el caso de los tratamientos RBN y RBP (del modelo BABA 10 dpq), los nódulos presentaron un mayor tamaño a comparación de NRN y NRP. Del mismo modo, los tratamientos {BR}N y {BR}P (del modelo BABA 3 dpq) presentaron nódulos más grandes en comparación con los controles. Debido a lo anterior, es importante destacar que la secuencia y la etapa biológica en la cual se están aplicando estos factores, influye no sólo la defensa en la parte aérea contra *P. syringae*, si no en la relación simbiótica entre

Rhizobium-leguminosa. Efecto relacionado con las UFC de *Rhizobium* presentes en los nódulos y el diámetro de los nódulos.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de **reducción de acetileno** podemos rescatar que en el modelo BABA 0 dpg, el tratamiento que presentó una mayor fijación fue BRN con 1.37 nmoles de etileno en función de 264 nódulos equivalentes en peso a 0.7013 g. Por su parte, en el modelo BABA 10 dpg, los tratamientos RBN y RBP presentaron una tendencia menor a la fijación a comparación de NRN y NRP. Por otro lado, el tratamiento {BR}P presentó una fijación de 1.45 nmoles de etileno en relación a 306 nódulos equivalentes a 0.8979g.

Con base en lo anterior, la eficiencia por gramo de nódulos fue menor para todos los tratamientos en los cuales se agregaba otro factor, ya sea BABA y/o *P. syringae*, a comparación del control NRN que no presentaba ningún otro estrés. Pero al realizar la comparación por el número de nmoles de etileno reducidos en relación al número o peso fresco de los nódulos, obtenemos que todos los tratamientos presentaron una mayor fijación a comparación del control NRN. Por lo anterior, hipotetizamos que la planta compensa la baja eficiencia de los nódulos individuales generando un conglomerado funcional regulado con la cantidad de fotosintatos que manda a los nódulos, que finalmente repercutirán en el tamaño de los nódulos, contenido bacteriano y número de nódulos.

Por todo lo anterior, podemos proponer los siguientes esquemas de acuerdo a los modelos planteados:

En el modelo de BABA 0 dpg, la aplicación de BABA y *R. tropici* de manera independiente y la posterior infección con *P. syringae*, genera la resistencia local en las plantas; sin embargo, la combinación de estos dos factores en la secuencia BABA 0 dpg, *R. tropici* 3 dpg y *P. syringae* 17 dpg, no produce una resistencia local en las hojas si no la proliferación de esta bacteria patógena (Figura 84).

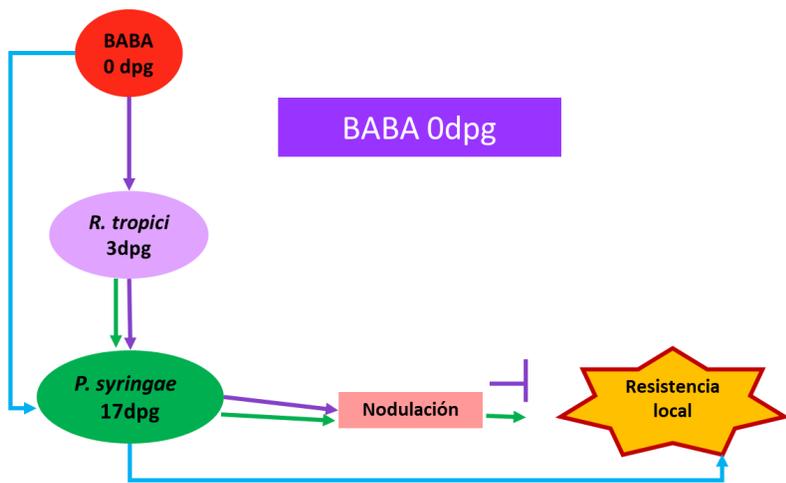


Figura 84. Modelo BABA 0 dpg. R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nada.

De igual manera que en BABA 0 dpq, la aplicación de BABA y *R tropici* de manera independiente, y la posterior infección con *P. syringae*, genera la resistencia local en las plantas en el modelo BABA 10 dpq. Sin embargo, la combinación *R. tropici* 3 dpq, BABA 10 dpq y *P. syringae* 17 dpq, tiene como resultado la resistencia local en las hojas, por lo que existe una disminución en la población bacteriana de este patógeno (Figura 85).

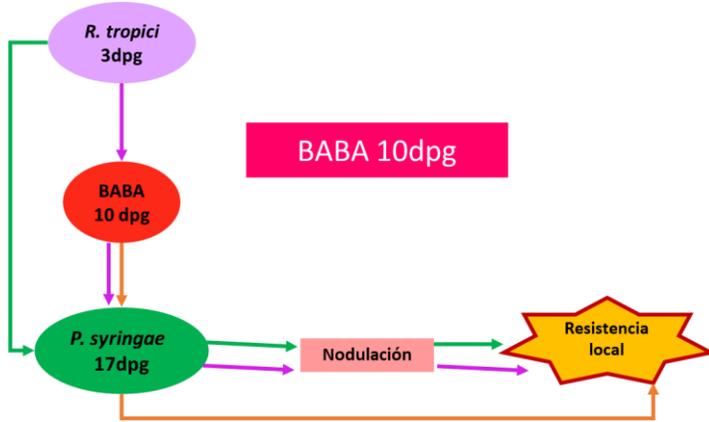


Figura 85. Modelo BABA 10 dpq. R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nada.

En el modelo BABA 3 dpq, la aplicación simultánea de BABA y *R tropici* a los 3 dpq, y la posterior infección con *P. syringae* a los 17 dpq, no genera una resistencia local si no una disminución en la defensa y proliferación bacteriana de este patógeno en las hojas (Figura 86).

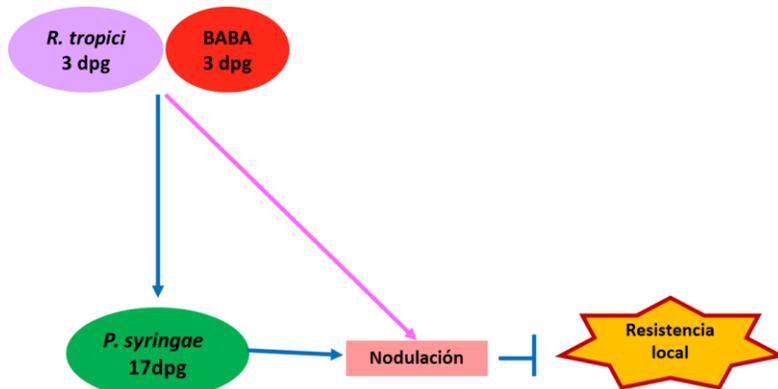


Figura 86. Modelo BABA 3 dpq. R=*R. tropici*-GUS, P=*P. syringae*, N= nada.

VII. CONCLUSIONES

1. La aplicación de BABA a una concentración de 100 μ M durante la germinación no afecta la morfología de la raíz, tanto en el tamaño como en el número de raíces secundarias; además no altera el tamaño del hipocótilo.
2. La secuencia de aplicación así como la edad biológica en la cual se aplique BABA 100 μ M influirá tanto en la parte aérea como en las raíces. Afectando el tamaño de la planta y su peso.
3. La combinación *R. tropici* con BABA y/o *P. syringae* generó una disminución en la altura en las primeras etapas vegetativas, debido a la baja cantidad de nitrógeno presente durante el inicio de la FBN en los nódulos y la activación en la defensa.
4. Durante los primeros días después de la maduración de los nódulos en las raíces, la FBN se genera en cantidades bajas, las cuales no logran satisfacer la demanda de nitrógeno generada por las plantas. Presentando una disminución en la altura, largo de la raíz principal, peso fresco de la parte aérea y raíces en las plantas inoculadas con esta bacteria.
5. Además, las combinaciones BRP (BABA 0 dpg) y RBP (BABA 10 dpg) presentaron el restablecimiento de la altura, pero su peso fresco en parte aérea y raíces fue comparable con el de las plantas inoculadas con *R. tropici*.
6. La aplicación de BABA no inhibió la interacción *R. tropici*-frijol, obteniendo en todos los tratamientos la presencia de nódulos funcionales.
7. Los tratamientos BNP (BABA 0 dpg) y BNP (BABA 10 dpg) presentaron un aumento en la defensa contra *P. syringae*, observando una disminución en el contenido de UFC presentes en las hojas infectadas, denominándose a este efecto como resistencia local.
8. El tratamiento NRP presentó una disminución en el contenido de UFC de *P. syringae* en las hojas infectados, resultando en una resistencia local.
9. Las combinaciones BRP (BABA 0 dpg) y {BR}P (BABA 3 dpg) no generaron un aumento en la defensa local de las hojas, por lo que existió un incremento en el número de UFC de *P. syringae*.

10. El tratamiento RBP del modelo BABA 10 dpg resultó en el mejor tratamiento, con disminución en el contenido de UFC de *P. syringae* en hojas infectadas. Además, no presentó alteraciones funcionales ni morfológicas en los nódulos presentes en las raíces.
11. En una relación con la secuencia en los factores y la edad biológica de aplicación, el total de fijación por gramo de nódulos se encuentra afectado.
12. Al analizar el total de fijación obtenido en las raíces noduladas por número de nódulos (o peso fresco de nódulos) encontramos que los tratamientos expuestos a BABA y/o *P. syringae*, presentaron una mayor fijación de nmoles de etileno que NRN.

VIII. PERSPECTIVAS

Realizar las tinciones con GUS para los tratamientos correspondientes de los modelos BABA 10 dpG y BABA 3dpG, así como la realización de los cortes histológicos, con el fin de determinar cambios en la morfología interna de los nódulos.

Analizar los cambios en la expresión de los genes de defensa para elucidar los genes responsables con los fenotipos observados en el tratamiento RBP en el modelo BABA 10 dpG en hojas sistémicas.

REFERENCIAS

- Acosta-Gallegos, J., Sánchez-García, B., Mendoza-Hernández, F., Jiménez-Hernández, Y., Salina-Pérez, R., Rosales-Serna, R., . . . Padilla-Ramírez, J. (2010). Rendimiento y reacción a enfermedades en frijol tipo flor de mayo en riego y temporal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 66-75.
- Allen, O., & Allen, E. (1981). *The leguminosae*. Madison, Wisconsin, USA: University of Wisconsin Press.
- Arnold, D., Lovell, H., Jackson, R., & Mansfield, J. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: from "has bean" to supermodel. *Molecular Plant Pathology*, 12(7): 617-627.
- Arvizu-Gómez, J. (2011). *Identificación de factores de transcripción involucrados en la regulación de los operones phtD y phtM de Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121. Tesis de Doctorado. CINVESTAV. Irapuato, Guanajuato.
- Babalola, O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett*, 32:1559-1570.
- Bacelli, I., & Mauch-Mani, B. (2016). Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Mol Biol*, 91: 703-711.
- Bacelli, I., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2017). The accumulation of B-aminobutyric acid is controlled by the plant's immune system. *Springer*.
- 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*, 20 (7): 443-452.
- Becerra, S., & Pastor-Corrales, M. (1994). Enfermedades del cultivo del frijol en el trópico de México. *XXI Congreso Nacional de Fitopatología* (pág. 56). Cuernavaca, Morelos: Soc. Mex. Fitopatol.
- Ben Rebah, F., Tyagyi, R., & Prévost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource Technology*, 82 (2): 145-151.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. (2012). Plant, growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potencial as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*, 35 (4):1044-1051.
- Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 28: 1327-1350.
- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., & Biagetti, E. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol*, 197: 300-313.
- Block, A., & Alfano, J. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opt in Microbiology*, 14: 39-46.

- Broughton, W., & Dilworth, M. (1971). Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochemical Journal*, vol. 125, 1075-1080.
- Broughton, W., Hernández, G., Blair, G., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- Caarls, L., Pieterse, C., & Van Wees, S. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci*, 6:170.
- Campisi, L., Yang, Y., Heiling, E., Herman, B., Cassista, A., Allen, D., . . . Jack, T. (1999). Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns inflorescence. *The Plant Journal*, 17(6): 699-707.
- Campos, A. (1991). *Enfermedades de frijol* (1era ed.). México: Trillas.
- Cardona, C., & Kornegay, J. (1999). Bean germplasm resources for insect resistance. *Clement S. Quisenberry S*, 85-99.
- Castaña-Zapata, J., & Mendoza, L. (1994). *Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica* (3era ed.). Honduras: Zamorano Academic Press.
- Castellanos, J., Peña-Cabriales, J., & Acosta-Gallegos, J. (1996). 15N-determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under water stress. *J Agric Res*, 126: 327-333.
- CIAT. (1981). *Enfermedades bacterianas de frijol: Identificación y control*.
- CIAT. (1984). *Morfología de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (2a ed.). Colombia.
- CIAT. (1986). *Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Colombia.
- CIAT. (2010). *Bean disease and pest: Identification and management*. Kampala, Uganda: Copyright.
- Cohen, Y. (1994). B-amino butyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 44: 273-288.
- Cohen, Y., & Gisi, U. (1994). Systemic translocation of 14C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induce resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 45: 441-456.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principle, mechanisms of action and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, 71: 4951-4959.
- Conrath, U. (2009). Priming of induced plant defence responses. *In Advances in Botanical Research*, 361-395.

- Conrath, U., Pieterse, C., & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, 7: 210-216.
- De Felipe Antón, M. (2004). Interacciones microorganismo-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. *An. R. Acad. Nac. Farm*, 70: 743-776.
- De Meyer, G., Audenaert, K., & Höfte, M. (1999). Pseudomonas aeruginosa 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in plant salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol*, 105:513-7.
- De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in Botanical Research*, 51: 223-281.
- Dénarié, J., & Cullimore, J. (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell Press*, 74 (6): 951-954.
- Dénarié, J., Debelle, F., & Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol*, 46: 497-531.
- Electron Microscopy Science*. (2017). Obtenido de Technovit® 7100 Sections for Histological and Industrial Application: <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/14653a.aspx>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantrager, X., Ollivares, J., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., & Sanchez, F. (2007). ast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes. *Nature Protocols*, vol. 2, 1819-1824.
- FAO. (1995). *Manual tecnico de la fijacion simbiotica del nitrogeno*. Roma.
- FAO. (1995). *Manual tecnico de la fijación simbiotica del nitrogeno Leguminosa/Rhizobium*. Roma.
- FAO. (2013). *Producción de hortalizas para la República de Guinea Ecuatorial*. África Central.
- Ferguson, A., & Johnston, J. (1980). Phaseolotoxin: chlorosis, ornithine acculation and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in different plants. *Physiol Plant Pathol*, 16: 269-275.
- Fourie, D. (2002). Distribution ad severity of bacterial diseases on dry beans (Phaseolus vulgaris L.) in South Africa. *J. Pathol*, 150(4-5): 220-226.
- Fu, Z., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annun Re Plant Biol*, 64:839-863.
- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K., . . . Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired

- resistance, activates genes expression and disease resistance in wheat. *Plant cell*, 8: 629-643.
- Gualtieri, G., & Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol*, 42: 181-194.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol*, 3: 307-319.
- Hagedorn, D., & Inglis, D. (1986). *Handbook of Bean Diseases*. Madison, Wisconsin.
- Hamiduzzaman, M., Jaka, G., Barnavon, L., Neuhaus, J., & Mauch-Mani, B. (2005). B-aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant Microbe*, 18: 819-829.
- Hardarson, G., Bliss, F., Cigales-Rivero, M., Henson, R., Kipe-Nolt, J., Longeri, L., . . . Tsia, S. (1973). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*, 152: 59-70.
- He, C., & Wolyn, D. (2005). Potencial role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*. *Plant Pathol*, 54: 227-232.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front Plant Sci*, 6: 171.
- Invitrogen. Thermo Fisher Scientific*. (2010). Obtenido de SuperScript™ II Reverse Transcriptase: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18064014>
- Jefferson, R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Bio Reporter*, 5 (1): 387-405.
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., . . . Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Ann Rev Phytopathol*, 32: 439-459.
- Kloepper, J., Ryu, C., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promoting of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- Koornneef, A., León-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F., Van Loon, L., & Pieterse, C. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol*, 147: 1358-1368.
- Lara-Flores, M. (2015). EL CULTIVO DEL FRIJOL EN MÉXICO. *Revista digital universitaria. UNAM*, 2: 1-11.
- Lee, Y., Hong, J., Sanwald, S., & Hwang, B. (2000). Histological and ultrastructural comparisons of compatible, incompatible and D-L-B-amino-n-butyric acid induced

- resistance responses of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 57: 269-280.
- Leghari, S., Wahocho, N., Laghari, G., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., . . . Lashari, A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9): 209-218.
- Life technologies*. (2012). Obtenido de Invitrogen. Trizol Reagent: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf
- Liu, L., Sonbool, F., Hout, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., . . . Dong, X. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat Commun*, 7: 13099.
- López, F. (1991). Definición de prioridades de investigación fitopatológica para la zona templada del Altiplano Central de México. *Agric. Téc. Méx.*, 17: 17-54.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth promoting rhizobacteria . *Annu Rev Microbiol*, 63: 541-556.
- Ma, Y., & Bliss, F. (1978). Seed proteins of common bean. *Crop Sci*, 17: 431-437.
- Martinez-Aguilar, K., Ramirez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J., Barraza, A., & Alvarez-Venegas, R. (2016). Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-17.
- Martínez-Aguilar, K., Ramirez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J., Barraza, A., & Álvarez-Venegas, R. (2016). Use of BABA and INA As Activators of a Primed State in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7: 653.
- Miranda, S. (1966). *Mejoramiento de frijol en México*. México: Secretaria de Agricultura y Ganaderia. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Mishina, T., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis . *Plant J*, 50:500-513.
- Mitchell, R. (1976). Bean halo-blight toxin. *Nature*, 260: 75-76.
- Mitchell, R. (1976). Isolation and structure of a chlorosis inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry*, 15: 1941-1947.
- Moat, A., Foster, J., & Spector, M. (2002). *Microbial Physiology*. Copyright.
- Mur, L., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentrations specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*, 140: 249-262.
- Murillo, J., Bardaji, L., & Führer, E. (2010). La grasa de las judías, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Phytoma*, 224, 27-32.

- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*, 7: 869-885.
- Navarrete, M. (1996). Variación patogénica de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en México y resistencia del frijol al tizón común. Tesis de Doctorado. *Colegio de Postgraduados. Instituto de Fitosanidad*, 1-11.
- Naznin, H., Kiyohra, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., & Hyakumachi, M. (2014). Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 9: e86882.
- Niu, D., Liu, H., Jiang, C., Wang, Y., Jin, H., & Gou, J. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis* dependent signaling pathways. *Mol Plant Microbes Interact*, 24: 533-542.
- Oka, Y., Cohen, Y., & Speigel, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL-B-amino-n-butyric acid. *Phytopathology*, 1138-1143.
- Oostendorp, M., & Seikora, R. (1990). In vitro interrelationship between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Rev Nematol*, 13: 269-274.
- Patel, P., & Walker, J. (1963). Relation of air temperature and age and nutrition of the host to the development of halo and common bacterial blights of bean. *Phytopathology*, 53 (4): 407-411.
- Peña-Cabriales, J. (2000). *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas*. Irapuato, Gto. México: ARCAL.
- Peña-Cabriales, J., & Castellanos, J. (1993). Effect of water stress on N₂ fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 152:151-155.
- Peña-Cabriales, J., & Grageda-Cabrera, O. (1999). Dinámica del nitrógeno en el ecosistema agrícola. En J. Peña-Cabriales, & O. Grageda-Cabrera, *Perspectivas de la Microbiología en México* (pág. 345). Instituto Politécnico Nacional.
- Phillips, D. (1992). *Flavonoids: plant signals to soil microbes, in Phenolic Metabolism in Plants*. New York: Plenum Press.
- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*, 5:308-316.
- Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28:489-521.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N., & Panopoulos, N. (1993). Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology*, 83: 965-970.

- Prudencio-Sains, J., Navarrete-Maya, R., Navarrete-Maya, J., & Acosta-Gallegos, J. (2008). Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. *Agricultura Técnica en México*, 201-212.
- Rudolph, K. (1984). Multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* "in planta" I: relation between bacterial concentration and water congestion of different bean cultivars and plant species. *Phytopathol*, 111:349-352.
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H., & Hunt, M. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809-1819.
- Saettler, A. (1991). Disease caused by bacteria. *Compendium of bean diseases* (págs. 29-30). St Paul, MN: APS Press.
- SAGARPA. (2017). *Aumenta 14 por ciento producción de frijol en México*. La Paz, Baja California Sur: SAGARPA.
- Sahebani, N., & Hadavi, N. (2009). Induction of H₂O and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. *Biocont Sci Technol*, 19: 301-313.
- Sahebani, N., Hadavi, N., & Zade, F. (2011). The effects of B aminobutyric acid on reistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiol Plant*, 33: 443-450.
- Samayoa, L. (2010). Explotación de la nueva variación genética y mejora genética del complejo de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de doctorado. *Grupo de Leguminosas del Departamento de Recursos Filogenéticos de la Misión Biológica de Galicia Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Pontevedra, España*.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kayning, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9:676-682.
- Schwartz, H. (1989). *Halo blight*. Cali, Colombia: CIAT.
- Schwessinger, B., & Zipfel, C. (2008). News from the frontline: Recent insights into PAMPS-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 389-395.
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. (2013). Nonhost resistance against bacterial pathogens. Retrospectives and prospects. *Annu Rev Phytopathol*, 51: 407-427.
- Singh, S., Teran, H., Muñoz, C., & Takegami, J. (1999). Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean. *Crop Science*, 391-397.
- Sponchiado, B., White, J., Castillo, J., & Jones, P. (1989). Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. *Exp Agr*, 25 (02): 249-257.
- Suarez-Rodriguez, M., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signalling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61:621-649.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinaver Associates. 3era Edición.

- Tang, C., Hinsinger, P., Jaillard, B., Rengel, Z., & Drevon, J. (2001). Effect of phosphorus deficiency on the growth symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21, 683-689.
- Taylor, J., Teverson, D., Allen, D., & Pastor-Corrales, M. (1996a). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathol*, 45, 469-478.
- Taylor, J., Teverson, O., & Davies, J. (1996b). Sources of resistance to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* races in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Pathol*, 45,479-485.
- Templeton, M., Sullivan, P., & Shepherd, M. (1984). The inhibition of ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* W by phaseolotoxin. *Biochem J*, 224: 379-388.
- Thermo Scientific*. (2013). Obtenido de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0222>
- Timmermann, T., Armijo, G., Donoso, R., Seguel, A., Holuigue, L., & González, B. (2017). Paraburkholderia phytofirmans PsJN Protects Arabidopsis thaliana against a virulent strain of *Pseudomonas syringae* through the activation of induced resistance. *The American Phytopathological Society*, 30 (3): 2015-230.
- Turner, J., & Mitchell, R. (1985). Association between symptom development and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in bean leaves treated with phaseolotoxin. *Plant Physiol*, 79: 468-473.
- USDA. (14 de Enero de 2013). *UMassAmherst*. Obtenido de The Center for Agriculture, Food and the Environment: <http://ag.umass.edu/vegetable/fact-sheets/bean-halo-blight>
- Van der Ent, S., Van Hulten, M., Pozo, M., Czechowski, T., Udvardi, M., Pieterse, C., & Ton, J. (2009). Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and B-aminobutyric acid: Differences and similarities in regulation. *New Phytol*, 183: 419-431.
- van Loon, L. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119: 243-254.
- van Loon, L., Bakker, P., & Pieterse, C. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36: 453-483.
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. *Microbiol Rev*, 59: 124-142.
- Van Wees, S., Van der Ent, S., & Pieterse, C. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 443-448.
- Vessey, J. (1994). Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene. *Plant and Soil*, 158:151-162.

- Vlot, A., Dempsey, D., & Klessig, D. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47: 177-206.
- Vos, I., Pieterse, C., & Van Wes, S. (2013). Costs and benefits of hormone regulated plant defense. *Plant Pathol*, 62:43-55.
- Weller, D., Mavrodi, D., van Pelt, J., Pieterse, C., van Loon, L., & Bakker, P. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 102: 403-412.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M., & Johnson, G. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79: 143-180.
- Xin, X. F., & He, S. (2013). *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 51:473-498.
- Yang, J., Kloepper, J., & Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerance abiotic stress. *Trends Plant Sci*, 14: 1-4.
- Zaumeyer, W., & Thomas, H. (1957). *A monographic study of bean diseases and methods for their control*. Department of Agriculture. Washington, United States: Technical Bulletin. No. 868.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J., & Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 12920-12925.